

Desenvolupament de proteïnes
quimèriques multifuncionals com
a vectors de transferència gènica
mediada per receptor

DESENVOLUPAMENT
DE PROTEÏNES QUIMÈRIQUES MULTIFUNCIONALS
COM A VECTORS DE TRANSFERÈNCIA GÈNICA
MEDIADA PER RECEPTOR

TESI DOCTORAL

Anna Arís i Giralt

Departament de Genètica i de Microbiologia
Institut de Biotecnologia i de Biomedicina



DESENVOLUPAMENT
DE PROTEÏNES QUIMÈRIQUES MULTIFUNCIONALS
COM A VECTORS DE TRANSFERÈNCIA GÈNICA
MEDIADA PER RECEPTOR

Memòria presentada per Anna Arís i
Giralt, per optar al grau de doctor en
Biologia, per la Universitat Autònoma
de Barcelona

Vist i plau del director de tesi,
Dr. Antoni Villaverde i Corrales

Anna Arís i Giralt

BELLATERRA, FEBRER DE 2003

*Al Carles
i als meus pares*

ÍNDIX

I. INTRODUCCIÓ.....	9
TERÀPIA GÈNICA	11
I.A.1. PRESENTACIÓ	11
I.A.2. VECTORS EN TRANSFERÈNCIA GÈNICA	15
I.A.2.1. Vectors vírics	15
I.A.2.1.a. Retrovirus	15
I.A.2.1.b. Adenovirus	18
I.A.2.1.c. Virus adenoassociats	21
I.A.2.1.d. Virus de l'herpes simple	23
I.A.2.1.e. Alfavirus.....	24
I.A.2.2. Vectors no vírics.....	29
I.A.2.2.a. DNA nu	29
I.A.2.2.b. Electroporació.....	30
I.A.2.2.c. Bombardeig de partícules	31
I.A.2.2.d. Fosfat càlcic i DEAE-dextran.....	32
I.A.2.2.e. Sistemes lipídics	34
i. Liposomes neutres i aniònics.....	34
ii. Liposomes catiònics	34
iii. Nous sistemes liposòmics	36
iv. Lípids no liposòmics	37
I.A.2.2.f. Sistemes basats en polímers	37
I.A.2.2.g. Transferència gènica mediada per receptor	39
i. Conjugats moleculars.....	42
<i>Agents d'unió a DNA.....</i>	43
<i>Lligands dirigits a tipus cel·lulars específics.....</i>	44
<i>Altres dominis que potencien la transferència gènica</i>	45
ii. Proteïnes quimèriques recombinants	47
<i>Unió al DNA: un prerrequisit per a la formació dels complexos.....</i>	47
<i>Incorporació de lligands per a l'endocitosi mediada per receptor</i>	48
<i>Activitat endosomolítica</i>	49
<i>Transport nuclear actiu</i>	50
ANTECEDENTS DEL TREBALL DE RECERCA	57
I.A.3. ENGINYERIA DE PROTEÏNES I ANTECEDENTS DEL GRUP	57
I.A.4. L'ENZIM β -GALACTOSIDASA COM A PROTEÏNA PORTADORA.....	59
I.A.5. EL LLAÇ β G- β H DEL VIRUS DE LA FEBRE AFTOSA	61
I.A.6. SISTEMA DE PRODUCCIÓ DE LES PROTEÏNES RECOMBINANTS	63

II. OBJECTIUS	65
III.RESULTATS	69
TREBALL I	71
TREBALL II.....	81
TREBALL III.....	91
TREBALL IV	103
TREBALL V.....	129
IV.DISSCUSSIÓ.....	149
IV.A.1. ENZIMS β -GALACTOSIDASA PRESENTADORS DE PÈPTIDS VÍRICS: POSSIBLES VECTORS DE TRANSFERÈNCIA GÈNICA	151
IV.A.2. L'ENZIM 249AL, UN NOU PROTOTIP DE VECTORS QUIMÈRICS MULTIFUNCIONALS EN TERÀPIA GÈNICA.....	153
IV.A.3. OPTIMITZACIÓ DEL PROCÉS DE TRANSFECCIÓ MEDIAT PER 249AL.....	157
IV.A.4. ESTUDI <i>IN VIVO</i> DEL VECTOR 249AL:APLICACIÓ AL SNC	160
IV.A.5. MILLORA DE 249AL.....	162
V. CONCLUSIONS.....	165
VI.ANNEX.....	171
VII. BIBLIOGRAFIA.....	183

DESENVOLUPAMENT
DE PROTEÏNES QUIMÈRIQUES MULTIFUNCIONALS
COM A VECTORS DE TRANSFERÈNCIA GÈNICA
MEDIADA PER RECEPTOR

I.INTRODUCCIÓ

TERÀPIA GÈNICA

I.A.1.PRESENTACIÓ

Els últims avenços en biologia molecular i cel·lular no tan sols han contribuït al coneixement de la base molecular de moltes malalties, sinó que també han proporcionat una tecnologia amb potencial de manipulació de gens *in vivo*. Així doncs, la teràpia gènica sorgeix com una estratègia terapèutica basada en la transferència de material genètic per al tractament de malalties d'origen genètic o infeccions, substituint, reparant o potenciant la funció biològica dels teixits o sistemes lesionats. En general, tant la utilització d'RNA com la de DNA constitueixen bones aproximacions per modular l'expressió gènica i obtenir beneficis terapèutics. En aquesta introducció, però, es farà poc èmfasi en processos de transferència d'RNA ja que la majoria dels estudis en teràpia gènica es basen en la utilització de molècules de DNA. Conceptualment, la tècnica requereix la identificació de les seqüències adequades per transferir i les cèl·lules diana apropiades per a cada tractament, al mateix temps que cal desenvolupar mètodes adequats que permetin introduir suficient àcid nucleic dins de les cèl·lules seleccionades. És important, també, considerar la intensitat de l'efecte terapèutic necessari en cada cas. Per exemple, no sempre és bo obtenir nivells elevats d'expressió d'un transgèn (gen transferit a un organisme mitjançant procediments de teràpia gènica), sinó que en alguns tractaments una producció petita de proteïna terapèutica és més adequada.

En l'actualitat la teràpia gènica considera tan sols la manipulació de cèl·lules somàtiques per a les quals ofereix un ampli ventall de tractaments: restaurar la funció d'un o de diversos gens responsables de desordres genètics, aturar la progressió de tumors, desenvolupar una resposta immunològica contra gens patògens, aturar malalties neurodegeneratives i, des d'un punt de vista no terapèutic, el marcatge cel·lular, aplicable, per exemple, a la identificació de l'origen de cèl·lules malignes en trasplantaments de moll d'os autòlegs.

Però els problemes com la falta de sistemes eficients en la transferència específica de material genètic, la manca d'una expressió gènica mantinguda i la presència de reaccions immunològiques de l'hoste, encara desafien el potencial d'aquesta tècnica. Quan parlem de transfecció ens referim a la transferència, la incorporació i l'expressió de l'àcid nucleic recombinant per part d'una cèl·lula eucariota. L'eficiència de transfecció depèn de la fracció de molècules de DNA que arriben al

nucli i, per tant, del seu procés de transferència i també de la quantitat de molècules que entren en el procediment de transcripció. Es pot aconseguir una elevada eficiència d'expressió gènica mitjançant promotors forts i *enhancers* (1), però és necessari millorar el rendiment de la transferència gènica. És per això que els principals estudis en aquesta línia d'investigació estan dirigits al desenvolupament de vectors que presentin l'especificitat i el rendiment requerits. Centraré, doncs, aquesta primera part de la introducció a fer un resum dels principals vectors utilitzats des del primer assaig clínic, aprovat el 1990, fins a l'actualitat i d'aquells que encara es troben en desenvolupament. Aquesta revisió pretén contextualitzar els objectius i procediments d'aquesta tesi, dirigida al disseny i la caracterització d'una nova generació de vectors recombinants no vírics, que promouen la transferència gènica mediada per receptor.

Podem considerar que un vector ideal és aquell que té capacitat de transfectar un tipus cel·lular específic independentment del seu estat mitòtic, sense limitacions pel que fa a la mida de l'àcid nucleic que transporta i sense cap mena de risc per al recipient que rep la teràpia gènica, i que presenta processos de producció fàcils, reproduïbles i adequables a un canvi d'escala.

En la transferència gènica podem distingir dues classes principals de vectors: els vírics i els no vírics. Alguns investigadors creuen que els virus presenten el major potencial com a vectors en teràpia gènica, ja que han estat seleccionats durant milions d'anys per transferir material genètic a diferents cèl·lules diana. En canvi, altres creuen que els seus efectes secundaris i les possibles infeccions víriques prèvies poden induir la resistència de l'hoste a ser transfectat, i això exclou el seu ús a llarg termini com a vectors en teràpia gènica.

Un cop el vector ha estat dissenyat i examinat en procediments *in vitro*, hi ha tres aproximacions principals (2) per portar a terme la teràpia gènica: *a) ex vivo*, en la qual les cèl·lules són extretes del cos, tractades amb el vector per tal de ser modificades genèticament i trasplantades de nou en el mateix cos. Aquest procediment es realitza generalment amb cèl·lules de la sang, perquè són les més fàcils d'extreure i retornar al cos. Les cèl·lules mare de la sang (*hematopoietic stem cells*) són un dels tipus cel·lulars més utilitzats en aquestes aplicacions, i són especialment atractives com a diana per a la teràpia gènica de malalties hematopoiètiques (3). Són cèl·lules multipotents, amb capacitat de proliferar fàcilment i diferenciar-se en els diferents tipus cel·lulars sanguinis. *b) in situ*, en la qual el vector o la cèl·lula productora es col·loca directament en el teixit que ha de ser transduït. *c) in vivo*, en la qual el vector és injectat directament al corrent sanguini, però la transferència gènica subsegüent queda restringida a una població cel·lular limitada. Aquesta última aproximació és preferible en la majoria de situacions per la seva senzillesa i el seu potencial en processos a gran escala, de manera que finalment els vectors desenvolupats per a teràpia gènica haurien de ser aplicables *in vivo*.

Taula 1. Possibles aplicacions de la teràpia gènica.

Malaltia	Defecte	Incidència	Cèl·lules diana
Genètica			
Immunodeficiència combinada severa (SCID/ADA)	Adenosina desaminasa (ADA) en ~ 25% dels pacients	Excepcional	Cèl·lules del moll de l'os o limfòcits T
Hemofília	A Deficiència en el factor VIII	En mascles 1:10.000	Fetge, múscul, fibroblasts o cèl·lules del moll de l'os
	B Deficiència en el factor IX	En mascles 1:30.000	
Hipercolesterolèmia familiar	Deficiència en el receptor de LDL	1:1 milió	Fetge
Fibrosi quística	Transport de sals defectiu en l'epiteli pulmonar	En caucàsics 1:3.000	Vies pulmonars
Hemoglobulinopaties: Talassèmia/ <i>Sickle-cell</i> anèmia	Defectes estructurals en la α - o β -globina	En certs grups ètnics 1:600	Cèl·lules del moll de l'os precursors d'eritròcits
Malaltia de Gaucher	Defecte en l'enzim glucocerebrosidasa	En jueus Ashkenazi 1:450	Cèl·lules del moll de l'os, macròfags
Deficiència en α 1-antitripsina: Emfisema hereditari	Falta de α 1-antitripsina	1:3.500	Cèl·lules del fetge i el pulmó
Adquirida			
Càncer	Causes diferent, incloent-hi les genètiques i les ambientals	1 milió/any als EUA	Diferents tipus cel·lulars
Malalties neurològiques	Parkinson, Alzheimer, lesions a la medul·la espinal	Parkinson: 1 milió Alzheimer : 4 milions als EUA	Neurones, cèl·lules glials, cèl·lules de Schwann
Malalties cardiovasculars	Arteriosclerosi	13 milions als EUA	Artèries, cèl·lules de l'epiteli vascular
Malalties infeccioses	SIDA, hepatitis B	En augment	Cèl·lules T, fetge, macròfags

Taula modificada de Inder M. et al. (1997) *Nature*, vol.389: 239-242

I.A.2. VECTORS EN TRANSFERÈNCIA GÈNICA

I.A.2.1. VECTORS VÍRICS

I.A.2.1.a. Retrovirus

Fins ara, els vectors retrovírics basats en el virus de la leucèmia murina (MuLV) han estat els més utilitzats en aplicacions de teràpia gènica i en la majoria d'assaigs clínics realitzats. En part, això ha estat per raons històriques, perquè van ser el primer sistema víric que es va establir (primer assaig clínic aprovat el 1990) i perquè des d'aleshores han estat molt ben estudiats. La família *Retroviridae* es caracteritza perquè els virus que la componen presenten un genoma d'RNA que es converteix en DNA un cop és dins la cèl·lula. Aquest codifica tres poliproteïnes bàsiques produïdes per *splicing* alternatiu a partir d'un sol transcrit d'RNA. A partir del gen *gag* es produeix una proteïna que conforma el nucli de la partícula vírica en el qual s'encapsiden dues còpies del genoma lineal d'RNA. Els productes del gen *pol* també estan associats al nucli víric, són enzims involucrats en la maduració de la partícula (proteasa) i en el metabolisme del DNA (transcriptasa inversa i integrasa). Per acabar el producte del gen *env* és una glicoproteïna que s'incorpora a l'embolcall lipídic, que cobreix la partícula retrovírica, després d'un procés de *budding* des de la cèl·lula hoste, o la cèl·lula encapsidadora en el cas de vectors per a teràpia gènica. La partícula retrovírica s'unirà al nou hoste mitjançant la interacció entre la proteïna Env i el receptor cel·lular apropiat. Flanquejant aquests tres gens hi ha els elements anomenats *long terminal repeats* (LTR), que són responsables de la integració en el genoma hoste i defineixen el principi i l'acabament del genoma víric. Al mateix temps, actuen com a *enhancer* i promotor, de manera que regulen l'expressió dels gens vírics. L'últim element del genoma de la partícula retrovírica és la seqüència encapsidadora (Ψ), que permet diferenciar l'RNA víric de la resta d'RNA de la cèl·lula en el moment d'encapsidar el material genètic. Tots els gens retrovírics poden ser substituïts per transgens, i aleshores es creen uns vectors que són totalment defectius en el procés de replicació. La transcripció d'aquests transgens es fa sota el control dels LTR o bé sota el control de promotors i *enhancers* que també han estat introduïts mitjançant enginyeria genètica juntament amb el transgèn. Aquest genoma quimèric és introduït en una cèl·lula encapsidadora que proporciona totes les proteïnes víriques en *trans*, però les quals no poden ser encapsidades perquè han sofert una deleció en el seu senyal Ψ . Així doncs, tan sols el genoma quimèric amb la seqüència Ψ és encapsidat i genera vectors retrovírics que posteriorment s'alliberaran al medi de cultiu en el qual estan creixent les cèl·lules productores. Els vectors retrovírics es poden recuperar d'aquest medi i es poden posar en contacte amb les cèl·lules diana que volem transfectar, amb la qual cosa s'aconseguirà la transferència vírica del transgèn anomenada *transducció* (vegeu figura 1).

Amb diferència, el major potencial d'aquests vectors rau en la seva capacitat d'integració en el genoma de la cèl·lula hoste. Tan sols hi ha un altre tipus de vector que permet una integració eficient: els vectors basats en virus adenoassociats, i que revisarem més endavant (apartat I.A.2.1.c). El procés d'integració ens ofereix la possibilitat de tenir una expressió estable, de manera que els provirus integrats passaran a les cèl·lules filles. En contra, però, també existeix la possibilitat que aquests vectors s'integrin en un lloc no favorable, de manera que no es porti a terme l'expressió del transgèn i s'interfereixi en el funcionament normal dels gens hostes veïns. La possibilitat que el vector retrovíric indueixi mutagènesi insercional és un risc que cal assumir: per exemple, la integració en un gen supressor de tumors podria accentuar la propensió de la cèl·lula a esdevenir tumoral. En aquesta línia, s'han fet algunes aproximacions per modificar la integrasa i dirigir la integració a zones preseleccionades (4). Recentment, però, s'ha descrit que en un dels assaigs clínics en el qual es tractaven immunodeficiències combinades severes (SCID) amb un vector retrovíric derivat del virus de la leucèmia murina (5), es produïa mutagènesi insercional per integració del vector en la regió reguladora d'un oncogen del cromosoma 11 anomenat *Lmo2*. Com a conseqüència, un dels nous tractats va desenvolupar un tipus de leucèmia (6).

Un altre desavantatge dels vectors retrovírics és la limitació pel que fa a la mida de les seqüències exògenes que poden transportar, ja que, per exemple, els vectors basats en el MuLV no poden admetre un àcid nucleic superior a 8,3 Kb. L'estabilitat dels vectors generats és un dels altres factors que cal tenir en compte: la presència de dues còpies del genoma en la partícula vírica i el procés de la transcripció inversa contribueixen a processos de reorganització i d'instabilitat.

Malgrat la seva gran capacitat de transfectar cèl·lules en cultiu *in vitro*, els retrovirus són poc eficients *in vivo* a causa de la seva incapacitat d'infectar cèl·lules que no estan en procés de divisió, com ara les dels músculs, el cervell, els pulmons, el fetge, etc. Tot i que això pot ser interpretat com un avantatge en el cas de teràpies anti-tumorals, ja que només es transfereixen gens terapèutics o suïcides a les cèl·lules canceroses que es troben en divisió activa, en general aquesta característica és un inconvenient. Dins de la família *Retroviridae*, però, els lentivirus, com l'HIV, sí que són capaços d'infectar cèl·lules que no es troben en divisió. La proteïna Env de l'HIV, però, tan sols reconeix cèl·lules que expressen la proteïna CD4 (cèl·lules CD4+) i, per això, en els vectors basats en HIV (*Human Immunodeficiency Virus*) aquest gen és substituït sovint per altres seqüències *env* de virus RNA que tenen un espectre d'infecció més ampli o més apropiat. Aquests tipus de vectors derivats de l'HIV desperten preocupacions de seguretat biològica, per la possibilitat de recombinació i pel risc que quedin alguns virus salvatges residuals. És per això que darrerament s'estan invertint molts esforços a disminuir al màxim els gens no essencials de l'HIV (7) i també s'han desenvolupat sistemes basats en lentivirus d'hostes no primats, com ara el FIV (*Feline Immunodeficiency Virus*)(8).

Com hem apuntat anteriorment, hi ha la possibilitat que existeixi recombinació en el procés de producció d'aquests vectors cosa que donarà lloc a la recuperació de retrovirus competents en la replicació (*replication competent retrovirus* o RCR). Els RCR són possibles virus patògens que resulten de la recombinació entre el vector i els components de la cèl·lula encapsidadora (9) o bé de l'adquisició de seqüències de retrovirus endògens provinents de preinfeccions de les cèl·lules encapsidadores. Amb la intenció de disminuir el risc de formació d'RCR s'han fet diverses aproximacions (2), com ara: *a*) dividir en diferents plasmidis els gens *gag*, *pol* i *env* aportats en *trans*, *b*) evitar l'ús de cèl·lules de ratolí productores, com ara les 3T3, per evitar el risc de recombinació amb seqüències víriques endògenes, *c*) utilitzar proteïnes Env heteròlogues, *d*) eliminar seqüències de la regió *gag* que suposadament augmentaven l'eficiència en el procés d'encapsidament però que posteriorment s'ha comprovat que no milloren el rendiment i *e*) introduir promotors i seqüències de poliadenilació heteròlegs que alhora també permetin augmentar el títol final de partícules víriques.

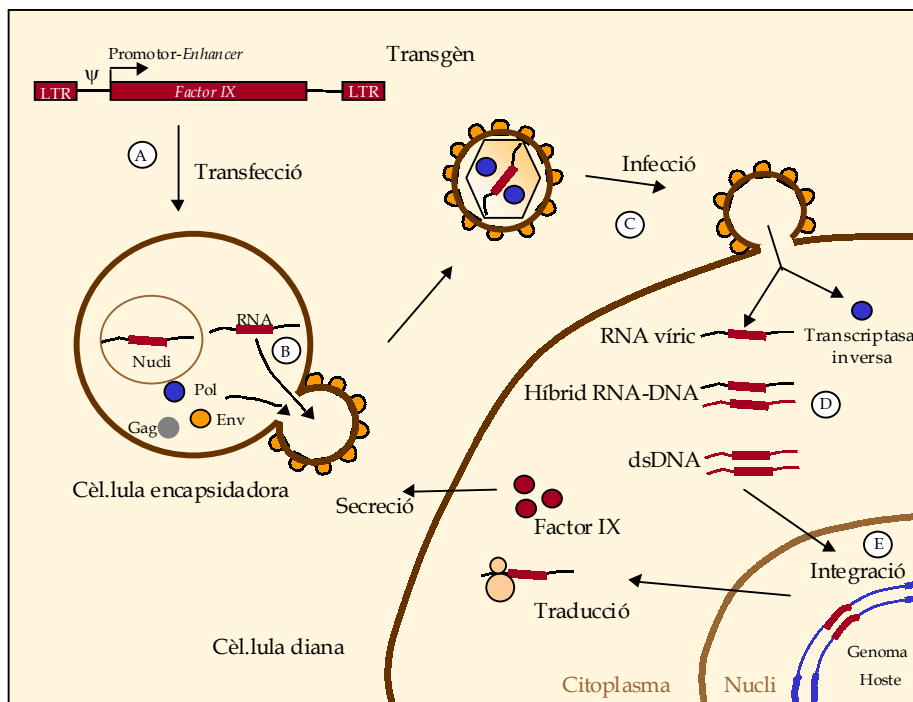


Figura1. Cicle de producció i infecció d'un vector retroviral. A) El transgèn (en aquest cas el gen codificant pel Factor IX), flanquejat per les regions LTR i acompanyat de la regió encapsidadora Ψ , és transfectat a les cèl·lules encapsidadores. Aquestes proporcionen els gens *gag*, *pol* i *env* en *trans*. B) En la cèl·lula encapsidadora es produeix la transcripció del transgèn i l'RNA resultant és incorporat en el vector retroviral. C) Es produeix la infecció vírica. La membrana del vector es fusiona amb la membrana de la cèl·lula diana i permet l'entrada de la molècula d'RNA. D) La transcriptasa inversa dirigeix la síntesi d'una molècula de DNA a partir del RNA i finalment es forma el dsDNA. E) El vector en forma de DNA s'integra en el genoma de la cèl·lula diana, és transcrit i traduït de manera que es produeix el factor IX. Figura modificada de: Inder M. Verma i Nikunj Somia (1997) *Nature* vol. 389: 239-242.

En aquest sentit, també s'ha augmentat la productivitat, lligant l'expressió de *gag*, *pol* i *env* a marcadors selectius que permeten un cribatge de línies productores d'altres concentracions de vectors i mitjançant la utilització de sistemes d'expressió transitoris. Amb aquestes estratègies s'arriba a aconseguir fàcilment ordres de 10^7 pfu/mL però, tot i així, cal tenir en compte que aquests mètodes no són aplicables a procediments a gran escala.

També és necessari fer estudis sobre la millora de l'eficiència i l'especificitat del transport de gens per vectors retrovírics. Amb aquest objectiu, els vectors poden ser "pseudotipats", és a dir, modificats perquè incorporin altres glicoproteïnes víriques responsables de la unió amb altres receptors cel·lulars (2). Malgrat tot, la majoria de proteïnes víriques tenen un ampli espectre d'hoste i tampoc es delimita molt l'especificitat dels vectors. També s'han concentrat esforços a enginyeritzar l'embolcall natural dels retrovirus (2;10) seguint diverses aproximacions: a) substituir el domini natural d'unió al receptor per un lligand o bé per un anticòs de cadena única (*single chain antibody*) dissenyat específicament per unir una molècula de superfície concreta. Aquesta estratègia millora realment l'especificitat, però va associada a baixos rendiments de transfecció, perquè no s'estimula la fusió i la posterior internalització cel·lular; b) concentrar els vectors sobre determinats tipus cel·lulars per la presència d'un domini addicional que bloqueja la infectivitat natural del virus i que posteriorment és eliminat per acció de proteases específiques del teixit diana. D'aquesta manera el virus acaba entrant a dins la cèl·lula mitjançant la seva via natural d'internalització; i c) incorporar en els vectors gens que codifiquin proteïnes quimèriques entre les de l'embolcall i altres lligands més específics (vegeu figura 2)

La majoria dels assaigs clínics que es realitzen amb aquests vectors es fan mitjançant aproximacions *ex vivo*, perquè permeten induir la divisió cel·lular en aquells casos en els quals les cèl·lules estaven en repòs i perquè s'eviten problemes com ara la manca d'especificitat, la incapacitat d'assolir alts títols necessaris per a aplicacions *in vivo* i la inactivació de part de les partícules víriques pel sistema immunològic. En la resposta immunològica, el sistema del complement reconeix els sucres específics de les glicoproteïnes produïdes en les cèl·lules encapsidores de ratolí de manera que una solució és posar a punt sistemes de producció basats en línies cel·lulars humanes (11). També cal tenir en compte que es pot induir una resposta immunològica humoral, sobretot en el cas d'administracions repetides.

I.A.2.1.b. Adenovirus

La família *Adenoviridae* està composta per virus DNA de doble cadena d'una mida aproximada de 36 kb i que en humans causen infeccions, generalment lleus, a les vies respiratòries superiors i als ulls. El seu genoma presenta nou complexos de transcripció principals, que es divideixen entre els transcrits *early* (E) i els transcrits *late* (L). Hi ha quatre transcrits *early* i es produeixen abans de la replicació del DNA. En la infecció inicial de la cèl·lula, la proteïna E1A, principal factor regulador en la

transcripció de E1B, E2, E3 i E4, es produeix a partir del transcrit de la regió E1. Les proteïnes codificades en les regions E2 i E4 són requerides per a la transcripció gènica tardana i les codificades en la regió E3 del virus ajuden el virus a evadir les defenses de l'hoste. Així doncs, es poden aconseguir vectors adenovírics deficients en el procés de replicació delecionant la regió E1 del genoma i utilitzant línies cel·lulars que proporcionin aquesta regió en *trans* per propagar-los. En aquesta zona delecionada s'insereix el transgèn, per recombinació homòloga, el qual pot restar sota el control del promotor E1 o d'un altre promotor heteròleg. Aquests vectors adenovírics poden infectar un ampli ventall de cèl·lules hoste, incloent-hi cèl·lules que no es troben en procés de divisió. Poden ser produïts amb facilitat a títols elevats (10^{11} - 10^{12} pfu/mL) i no s'integren en el genoma de la cèl·lula hoste, sinó que es repliquen com a elements episomals (extracromosòmics) en el nucli de la cèl·lula infectada.

Quan s'infecten cèl·lules *in vivo* amb vectors basats en adenovirus, s'obtenen elevats nivells d'expressió transgènica. Aquest pic d'expressió, però, només es detecta entre un i set dies després de la injecció; aleshores baixa considerablement, i és quasi indetectable entre les dues i quatre setmanes post-injecció. Això s'ha corroborat per a la majoria de rutes d'administració, amb l'excepció de la injecció directa a teixits immunoprivilegiats, com ara el cervell (12). En canvi, s'ha aconseguit una major persistència de l'expressió gènica en ratolins immunodeficients (13), cosa que indica que el sistema immunològic és el responsable de l'existència d'un pic d'expressió breu. Sembla que en aquesta primera generació de vectors hi ha certa expressió de gens adenovírics que estimulen una reacció immunològica potent. En aquesta es desencadenen les respostes cel·lular i humoral, s'eliminen les cèl·lules infectades i a causa de que també s'evoca una resposta de memòria, s'evita l'expressió del transgèn després d'una segona administració. Els anticossos neutralitzants segresten el virus recombinant abans que pugui infectar les cèl·lules diana i si algun virus aconsegueix escapar d'aquest atac, els limfòcits T citotòxics s'encarreguen d'eliminar la cèl·lula infectada. A més a més, cal tenir en compte que, desafortunadament per a la teràpia gènica, la majoria de la població humana ja té anticossos contra adenovirus a causa d'infeccions naturals prèvies. En alguns estudis s'han utilitzat immunosupressors convencionals (14) i s'ha aconseguit allargar l'expressió del transgèn i reduir la resposta antiadenovirus en animals experimentals. Aquesta pràctica, però, no es recomana en humans, ja que comporta el risc d'infeccions oportunistes i la possible infecció per algun adenovirus salvatge contaminant. L'alternativa és l'administració d'immunomoduladors com els anticossos anti-CD40L (15) i CTLA4Ig (14), que bloquegen la interacció entre les cèl·lules T i les cèl·lules presentadores d'antígen. Tot i aquestes possibles alternatives, cal posar més èmfasi en l'optimització d'aquests vectors per evitar que es desencadenin respostes tan potents en l'hoste. A més a més, també en relació amb l'estimulació del sistema immunològic, hi pot haver la producció d'adenovirus competents en la replicació (*replication competent adenovirus* o RCA), a causa de la recombinació homòloga entre el genoma del vector adenovíric i les seqüències proporcionades en *trans* per la cèl·lula encapsidadora. El procés d'eliminació

d'aquests virus recombinants és molt difícil i per això normalment les preparacions que s'utilitzen en la majoria dels estudis realitzats no han estat purificades. Per evitar aquestes recombinacions es va començar a construir una segona generació de vectors en la qual es reduïa la regió E1 aportada en *trans* o bé s'augmentava la deleció en el vector recombinant, de manera que es disminuïen regions complementàries. Així, el risc de formació d'RCA és més petit, es rebaixa la càrrega de gens adenovírics i, en definitiva, la intensitat de la resposta immunològica és menor, de manera que es prolonga el temps d'expressió gènica. Altres estratègies combinen mutacions en regions E2A que no permeten que el vector dugui a terme la replicació a 37°C. Recentment s'ha descrit la primera mort humana deguda a un tractament d'adenovirus E1-delecionat i E2A-sensible a la temperatura, en un assaig clínic per al tractament de la producció defectiva de l'enzim OTC (ornitina transcarbamilasa), responsable d'eliminar l'amoni en el fetge. El pacient va rebre una de les dosis més altes d'adenovirus administrades a humans ($3,8 \times 10^{13}$ pfu/mL) i va desenvolupar una resposta prou important per causar la seva mort (16). A part que una dosi lleugerament més elevada pot produir reaccions adverses desproporcionades, els investigadors responsables van descriure que el vector víric injectat localment en el fetge s'havia disseminat per molts altres teixits, que hi havia una infecció paral·lela amb un parvovirus que també podria haver accentuat aquests efectes secundaris i, a més a més, que el genoma del vector presentava seqüències duplicades que no es trobaven en l'adenovirus original. El Recombinant DNA Advisory Comitee (RAC) va remarcar, davant d'aquest fet, la necessitat d'intensificar el control de tots els assaigs clínics en teràpia gènica vírica que s'estan fent, ja que el perill de toxicitat pot variar entre diferents produccions d'un mateix vector i entre diferents pacients. A part d'un seguiment acurat de l'assaig clínic, cal comprovar la integritat de la seqüència del vector abans de la seva administració, els nivells de citocines abans i després de començar la teràpia gènica i la presència en el pacient d'altres virus que puguin propiciar complicacions en el tractament.

Amb la intenció d'aconseguir una major disminució de la resposta inflamatòria, s'han delecionat tots els gens vírics i s'han deixat tan sols els elements que defineixen el principi i el final del genoma, juntament amb la seqüència encapsidadora. Aquesta estratègia també permet transferir transgens més grans. En aquest cas, les funcions en *trans* són aportades per un virus col·laborador (*helper*) (17). L'eficiència d'aquests vectors *in vitro* és semblant a l'aconseguida amb vectors de primera generació i, tot i que les dades que hi ha *in vivo* són limitades, se suggereix una durada considerable de l'expressió transgènica (18). Entre les estratègies per resoldre els problemes associats a l'administració repetida de vectors adenovírics hi ha la utilització de vectors basats en diferents serotips, de manera que un serotip no desperta respostes immunològiques contra d'altres i permet realitzar diferents administracions d'un mateix transgèn (19). Tot i així, és una aproximació complicada, perquè només hi ha dos serotips dels quals s'hagin desenvolupat vectors per teràpia gènica, i cal tenir en compte que cada vector presenta una eficiència de transfecció i expressió gènica en un tipus cel·lular concret. Molts

investigadors creuen que invertir els esforços en una expressió persistent és més apropiat que no pas administrar diferents vectors.

L'especificitat de les infeccions adenovirals *in vitro* està dominada pel receptor CAR (*coxsackie virus-adenovirus receptor*) i per integrines, tot i que *in vivo* el paper d'aquests receptors no està tan ben establert. Els vectors adenovírics poden infectar

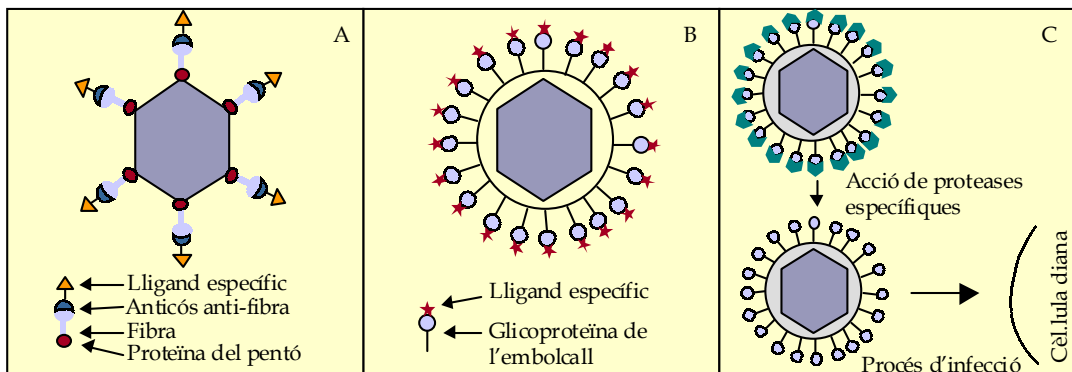


Figura 2. Aproximacions per modificar el tropisme de vectors vírics mitjançant enginyeria de proteïnes. A) Vector adenovíric quimèric amb anticòssos biespecífics anti-fibra que alhora porten unit un lligand específic pel teixit diana. B) Vector retrovíric quimèric que presenta un lligand específic fusionat a la glicoproteïna de l'embolcall. C) Vector víric que presenta un domini addicional que bloqueja la seva infectivitat natural però que posteriorment és eliminat per acció de proteases específiques del teixit diana. Esquemes modificats de Kah-Whye Peng (1999) *Molecular Medicine Today* vol. 5: 448-452.

diferents teixits dependent de la ruta d'administració, i això fa que sovint sigui necessari acotar la seva especificitat a un tipus cel·lular concret. Per aconseguir delimitar aquest objectiu s'ha modificat el tropisme dels vectors, enginyeritzant proteïnes víriques, fusionant-les amb lligands o anticòssos més específics o bé substituint-les per altres proteïnes naturals de virus (20) (figura 2).

Les limitacions d'aquests vectors també han estimulat els investigadors a fer híbrids entre els adenovirus, que tenen la capacitat d'infectar cultius en diferents estats cel·lulars, i els retrovirus, que asseguren una expressió gènica a llarg termini (21). Aquests híbrids, però, no són capaços d'infectar eficientment cèl·lules que no es troben en procés de divisió i per això s'ha promogut l'estudi d'altres híbrids, com els Ad/lentivirus o els Ad/adenoassociats (22).

Una aplicació dels vectors adenovírics és la transferència de gens capaços d'estimular la citotoxicitat contra cèl·lules canceroses. En aquest cas, la resposta immunològica contra les proteïnes víriques potencia l'efecte antitumoral. Les dades experimentals que hi ha també suggereixen que els vectors adenovírics actuals poden ser exitosos en aplicacions en les quals una expressió gènica transitòria és suficient, com per exemple en l'angiogènesi terapèutica per a les malalties de l'artèria coronària (2).

I.A.2.1.c. *Virus adenoassociats*

Els virus adenoassociats (AAV) són virus de la família *Parvoviridae*, tenen un genoma petit de DNA de cadena senzilla i requereixen un virus *helper* per a la seva replicació, com ara un adenovirus o un herpes simple. Els seus dos gens (*cap* i *rep*) es troben flanquejats pels *inverted terminal repeats* (ITR), que defineixen el començament i el final del virus i contenen la seqüència d'encapsidació. El gen *cap* codifica proteïnes de la càpsida vírica i el producte del gen *rep* està involucrat en els processos de replicació i integració. Els AAV són virus humans i la majoria de la població n'és seropositiva, tot i que fins ara no se'ls ha associat cap patologia. Poden infectar molts tipus cel·lulars, en divisió o sense divisió, i en presència del gen *rep* el seu genoma es pot integrar preferencialment en el cromosoma 19 humà. En els vectors derivats d'AAV, el transgèn substitueix els gens *cap* i *rep*, de manera que no queden gens vírics que estimulin la resposta immunològica cel·lular de l'hoste i desencadenin processos inflamatoris. La resposta primària de l'hoste és deguda a la càpsida vírica i a la presència d'anticossos neutralitzants. És difícil demostrar si la forma persistent dels vectors AAV és deguda a un procés d'integració en el genoma hoste o bé a una forma episomal d'alt pes molecular, detectada en els teixits com ara el múscle o el fetge (23).

La principal limitació d'aquests virus com a vectors és la poca capacitat d'allotjar gens (entre 4 i 4,5 kb) i, fins fa poc, la falta de sistemes de producció eficients en l'obtenció d'un alt títol de virus. Les propietats citostàtiques i tòxiques de la proteïna Rep ocasionen problemes en l'obtenció d'una línia encapsidadora eficient i, com a conseqüència, la producció es pot obtenir mitjançant la transfecció de dos vectors plasmídics, portadors de les funcions Rep i Cap, en cèl·lules 293 infectades amb adenovirus com a virus *helper*. Aquests primers sistemes de producció tenen un rendiment baix, donen una barreja de vectors AAV i adenovírics i presenten problemes de recombinació entre el plasmidi portador del vector AAV i els plasmidis complementaris, de manera que es generen AAV salvatges o bé virus adenoassociats competents en la replicació (rcAAV) (24).

Per evitar la segregació posterior de les partícules adenovíriques *helper* dels vectors AAV, es poden transfectar les cèl·lules productores amb plasmidis que aporten les funcions necessàries. Aquest procés, però, augmenta la complexitat de manipulació del DNA i dificulta el canvi d'escala en la seva producció. Amb la intenció de millorar aquesta estratègia, s'han desenvolupat diverses aproximacions com ara: a) concentrar els gens *cap-rep* i els gens codificants per les proteïnes de l'adenovirus *helper* en un sol plasmidi (25), b) generar línies cel·lulars que contenen de forma estable els gens *cap-rep*, el genoma del vector (26) o bé ambdós elements i c) també s'han desenvolupat virus híbrids entre AAV i herpes simple (27).

D'altra banda, per evitar recombinacions homòlogues i la generació de virus adenoassociats competents en la replicació (rcAAV), s'han desenvolupat línies cel·lulars en les quals s'incorporen *cassetes rep* i *cap* sense els ITR i es manté de forma

estable un plasmidi amb el vector AAV. Aquest procediment, però, implica que les cèl·lules han de continuar sent infectades per virus *helper* i, per tant, cal introduir un procés de purificació per tal d'excloure'ls (2). El mètode de gradient de CsCl és el procediment clàssic de purificació, però és inacceptable en processos a gran escala. S'han desenvolupat altres sistemes de purificació basats en diferents mètodes cromatogràfics (24) més adequats. Una altra aproximació per disminuir les regions homòlogues entre el plasmidi portador del vector AAV i el plasmidi *helper*, és la incorporació de promotors heteròlegs, tot i que no s'acaben d'eliminar del tot els rcAAV (24), es produeixen en menor quantitat quan s'utilitzen línies cel·lulars portadores de *rep* i *cap* en *cassetes* separats (24).

L'eficiència de transfecció *in vitro* de vectors basats en AAV es veu influenciada per l'activitat metabòlica. Si aquesta és elevada (les cèl·lules estan en procés de divisió), el pas de ssDNA a dsDNA és més ràpid, però com que els vectors que no tenen la proteïna Rep s'integren amb menys eficiència i menys específicament, el factor de dilució d'aquestes partícules serà més gran. En canvi, si intentem transduir cèl·lules quiescents, el pas de ssDNA és molt lent, tot i que *in vivo* s'ha vist que aquest existeix i que es produeixen nivells terapèutics de gens d'una manera constant.

I.A.2.1.d. Virus de l'herpes simple

Els virus Herpes simple-1 (HSV-1) és un virus de la família *Herpesviridae* que conté un genoma de DNA de doble cadena, d'uns 152 kb i que aproximadament codifica 80 gens. Unes 44 kb de la seva seqüència poden ser eliminades, de manera que poden transportar transgens grans o fins i tot diversos *cassetes* de transgens. Els herpesvirus tenen la capacitat d'infectar molts tipus cel·lulars i poden establir un estat d'infecció latent en el sistema nerviós central sense integrar-se en el genoma hoste. L'HSV-1 conté únicament dos promotors específics de neurones, que resten actius en el procés de latència i s'anomenen *latency active promoters* (LAP1 i LAP2). Aquests poden ser adaptats per expressar proteïnes terapèutiques sense modificar l'estat de latència ni estimular el rebuig del sistema immunològic cap a les cèl·lules infectades. Aquest estat latent es caracteritza per l'absència de la producció de proteïnes lítiques, de manera que els gens essencials que les codifiquen poden ser deletats per crear vectors completament defectius en la replicació i que després de la infecció entren directament en estat de latència permanent. Després de la infecció vírica de l'HSV hi ha l'expressió d'un petit nombre de gens *immediate early* (IE), com ara els ICP0, 4, 6, 22, 27 i 47. És una expressió induïda per la proteïna transactivadora VP16, que arriba dins la cèl·lula com una part del tegument víric (capa densa de proteïnes que recobreix la càpsida vírica i que està sota la bicapa lípidica que conforma l'embolcall). Aquests gens IE són importants per a la inducció de l'expressió dels gens *early* (E) i *late* (L) requerits per a l'encapsidació vírica i la replicació (28). Com que els gens d'HSV s'expressen en una cascada seqüencial, la mutació d'ICP4 inhibeix l'expressió de gens E tardans i L (2), de manera que resulta en un virus incapaç de produir partícules víriques. També es deleten altres gens

IE, de manera que es disminueix la toxicitat dels vectors basats en HSV i es prolonga l'expressió gènica en cultius cel·lulars *in vivo* (28).

Els vectors han de ser propagats en cèl·lules enginyeritzades per complementar les funcions víriques necessàries. Una alternativa a la producció d'HSV deficients en replicació mitjançant cèl·lules complementadores és la utilització d'amplicons: un plasmidi que conté un origen de replicació, una seqüència d'encapsidació d'HSV i un origen de replicació de bacteris (29). Els amplicons són propagats en bacteris i després cotransfectats amb cosmidis que porten el genoma d'HSV sense seqüències d'encapsidació. Així es genera un estoc de virus *helper-free*, que no contenen gens vírics, de manera que s'elimina qualsevol toxicitat associada a l'expressió de proteïnes HSV. El problema és que els títols són molt baixos i que en el procés d'obtenció d'amplicons es produeix recombinació, la qual pot donar lloc a virus salvatges (30). En l'última generació d'amplicons s'han utilitzat múltiples fragments de restricció del genoma d'HSV en la llibreria cosmídica (31) i així s'eviten processos de recombinació. Val a dir, però, que el títol que s'aconsegueix amb aquest sistema és molt baix (menys de 10^7 pfu/mL) i que l'expressió *in vivo* encara no ha estat del tot testada (31).

Igual que en altres virus, es pot augmentar l'especificitat dels vectors basats en HSV substituint el lligand de reconeixement cel·lular del virus per altres de més específics. Però el fet que en el procés d'unió cel·lular hi estiguin involucrades diverses glicoproteïnes i que aquestes siguin estructuralment complexes ha fet que l'obtenció d'aquests virus recombinants sigui una tasca difícil.

I.A.2.1.e. Alfavirus

Els alfavirus pertanyen a la família *Togaviridae* i d'ells deriva un grup de vectors relativament nous en la transferència gènica. Són molt prometedors com a vacunes preventives i terapèutiques contra malalties infeccioses i cancerígenes ja que tenen un ampli ventall d'hostes i poden infectar cèl·lules en divisió i en repòs. Dirigeixen una expressió transitòria i per això són adequats en aplicacions en les quals no es necessita una expressió gènica a llarg termini. Aquests vectors, com tots els que deriven de virus +ssRNA, constitueixen una classe de vectors anomenats *replicons*, que retenen gens del virus parental, com la replicasa, de manera que poden dirigir la seva pròpia multiplicació en la cèl·lula hoste amb la qual cosa produeixen nivells molts elevats d'expressió transgènica. Són virus força simples. Normalment quatre dels seus set gens vírics acompanyen el transgèn i aporten totes les funcions necessàries que es requereixen per a la seva expressió.

En l'enginyeria dels alfavirus el format més comú és el d'un replicó RNA incompetent en la propagació. El primer vector basat en alfavirus es va construir a partir d'un clon de cDNA de SIN (*Sindbis Virus*) en el que es substituïa la regió que codificava la poliproteïna estructural per un gen heteròleg i es mantenia l'activitat transcripcional mediada pel promotor (32). Després de transfectar cèl·lules en cultiu

amb el replicó, el transgèn es sintetitzava a quantitats elevades, però com que els replicons SIN no sintetitzen proteïnes estructurals, el transgèn tan sols s'expressava en les cèl·lules transfectades inicialment.

La poca eficiència de transfecció i la labilitat del DNA són els dos principals factors responsables del baix rendiment d'aquest procés, sobretot *in vivo*. Per això s'han desenvolupat mètodes per ensamblar l' RNA en un virió que permet la transferència mediada per receptor. Inicialment els replicons eren encapsidats mitjançant un virus salvatge *helper* que coinfectava les cèl·lules transfectades amb el replicó (32), però com que en el *pull* resultant hi havia virus *helper* salvatges, es va considerar més apropiat utilitzar-ne un que fos defectiu. Aquest es transcrivia *in vitro* i es cotransfectava en les cèl·lules productores amb el replicó de DNA. Tot i que aquest mètode era efectiu, existia un cert nombre de virus competents en replicació (RCV) que contaminaven la mostra. Posteriorment s'ha posat l'èmfasi a desenvolupar altres mètodes de producció mitjançant la transfecció de les cèl·lules productores amb tres RNA: un que codifica pel vector i els altres dos que codifiquen pel virus *helper* i en els quals s'expressen per separat els gens de la càpsida i de les glicoproteïnes de l'embolcall, cosa que redueix el nivell de possibles RCV contaminants (33). L'altra estratègia es basa en vectors vírics subgenòmics que són competents en la replicació i la propagació: s'insereix un promotor subgenòmic addicional en el clon de cDNA de SIN, de manera que des d'un promotor es dirigeix l'expressió dels gens que codifiquen per les proteïnes estructurals i des de l'altre es controla l'expressió dels gens que codifiquen per les proteïnes heteròlogues (34). Gràcies al fet que aquest vector es propaga, no hi ha cap necessitat de posar a punt protocols de la seva producció a gran escala. Desafortunadament, l'ús d'aquests vectors s'ha vist limitat per l'aparició de mutacions en la zona del gen heteròleg, sobretot quan els transgens són més grans d'1-2 kb. La freqüència d'aquestes mutacions es redueix quan el promotor que s'incorpora es situa en direcció 5' (*upstream*) del natiu i dels gens de les proteïnes estructurals (35). Aquests vectors dsSIN, i també els anàlegs amb VEE (*Venezuelan Equine Encephalitis Virus*), han demostrat que són útils com a vacunes en diferents models animals (35;36), però de totes maneres aquesta estratègia no és gaire recomanable perquè sempre hi ha cert risc que es produeixin deleccions.

Per obtenir una producció d'alfavirus a una escala raonable cal eliminar algun dels procediments de transfecció amb RNA. I és per això que, com en el cas d'altres vectors vírics, s'han generat línies encapsidadores estables (37) que produeixen nivells elevats de proteïnes estructurals, les quals expressen els gens de la càpsida i de les glicoproteïnes de l'embolcall des de *cassetes* separats de manera que es disminueix el risc de formació d'RCV. Aquesta síntesi s'indueix per una replicasa no estructural suplementada en *trans* quan es fa la transfecció amb el replicó alfavirus. En comptes de transfectar les cèl·lules diverses vegades, només es fa un cop i s'utilitza el sobrenedant de les línies encapsidadores per infectar un altre cultiu d'aquesta línia. Així s'obtenen títols elevats ($>10^8$ pfu/mL). L'altre objectiu és aconseguir el desenvolupament de línies cel·lulars productores del vector (*vector-*

producer cell lines o VPCL), en les que, a diferència de les descrites anteriorment, s'incorpora de forma estable un *cassete* per a la transcripció del replicó.

En aplicacions com ara la vacunació, la teràpia antitumoral i la transferència de factors de creixement, la producció de transgèn en elevades quantitats en un curt període és adequada i avantatjosa. En canvi, per a altres aplicacions en teràpia gènica seria convenient allargar l'expressió gènica i, sobretot, disminuir els efectes citopàtics dels alfavirus ja que la infecció de cèl·lules de mamífer és lítica (38) i, a més a més, en alguns tipus cel·lulars estimula l'apoptosi (39). S'han aïllat alguns mutants de Sindbis virus que són capaços de fer infeccions permanents en cèl·lules BHK, ja que no mostren un fenotip citopàtic (40). El problema que hi ha amb aquests vectors és que la seva infecció està restringida a unes línies cel·lulars concretes i que encara no es disposa de la seva caracterització *in vivo*.

Els alfavirus tenen un ampli ventall d'hostes i presenten la capacitat d'infectar un gran nombre d'animals. Els humans no en són l'hoste més important, però poden ser infectats esporàdicament. L'especificitat dels vectors basats en Sindbis virus ha estat modificada mitjançant la manipulació de la glicoproteïna de l'embolcall E2, la qual s'uneix al receptor de la laminina, que es troba altament conservat (41). En alguns treballs es demostra que regions concretes de la proteïna E2 poden ser substituïdes per epítops de virus heteròlegs (42) amb la qual cosa es redirigeix el seu tropisme i, alhora, s'aconsegueix immunitzar animals contra aquests virus heteròlegs. També es demostra que es poden incorporar altres lligands específics de receptors (43) o bé anticossos monoclonals específics d'alguns tipus cel·lulars, com ara les cèl·lules canceroses, que sovint es mostren refractàries a la infecció per alfavirus (43). Els principals inconvenients d'aquestes estratègies són la baixa capacitat d'infecció i el baix títol de producció de partícules víriques que incorporen lligands grans (43).

Taula 2. Principals característiques dels vectors vírics

Característica del sistema de transferència	Retrovirus	Adenovirus	Virus adenoassociats	Virus de l'herpes simple	Alfavirus
Mida màxima del transgèn	7-8 kb	30-35 kb	4-4,5 kb	40-50 kb	5 kb
Concentració (partícules víriques/mL)	10 ⁷ -10 ⁸	10 ¹¹ -10 ¹²	10 ¹¹ -10 ¹²	10 ⁶ -10 ⁷	10 ⁸ -10 ⁹
Via administració	<i>Ex vivo</i> i, en el cas dels lentivirus, <i>ex vivo/in vivo</i> *	<i>Ex vivo/In vivo</i> *	<i>Ex vivo/In vivo</i> *	<i>Ex vivo/In vivo</i> *	<i>Ex vivo/In vivo</i> *
Localització intracel·lular del vector	Integrat en el genoma hoste	Episomal	Episomal o en presència del gen <i>rep</i> integrat en el cromosoma 19 del genoma hoste	Episomal de forma estable	Episomal
Expressió	Estable	Transitòria	Transitòria o estable	Transitòria fins a 18 mesos en el SNC	Transitòria
Avantatges	Expressió estable després de la integració	Poden infectar cèl·lules en repòs i en divisió, fàcil canvi d'escala	Possibilitat d'integració específica en el genoma hoste, infecta cèl·lules en repòs i en divisió, comparativament poca immunogenicitat	Tropisme per teixit neural, elevada capacitat de transportar transgens	Infecten cèl·lules en repòs i en divisió
Desavantatges	Només poden infectar cèl·lules en divisió (excepte els lentivirus), integració en el genoma hoste a l'atzar, mutagènesi insercional, possibles vectors competents en replicació	Immunogenicitat elevada, possibles vectors competents en replicació	Mida del transgèn petita, possibles vectors competents en replicació, reorganitzacions en la inserció durant la integració, pèrdua de la capacitat d'integració dirigida sense <i>rep</i> , procés de purificació difícil i no aplicable a gran escala	Patogenicitat, possibles vectors competents en replicació	Citotoxicitat, risc de virus competents en replicació, poca capacitat de transportar transgens

* dins de les aproximacions *in vivo* també s'inclouen les realitzades *in situo*

I.A.2.2. VECTORS NO VÍRICS

Tal i com s'ha descrit anteriorment, els virus són molt eficients com a vehicles de transferència gènica però presenten limitacions importants en el seu ús en teràpia gènica. Entre aquestes cal destacar la seva toxicitat i immunogenicitat, la possible mutagènesi insercional, l'especificitat cel·lular inadequada, les limitacions pel que fa al volum d'àcid nucleic, els problemes i elevats costos de producció, i per acabar el risc de recombinació i producció de partícules competents en replicació. Tenint en compte aquestes limitacions, els vectors no vírics suposen una alternativa atractiva, bàsicament per la simplicitat del seu ús, la fàcil producció a gran escala i la manca de respostes immunològiques específiques.

I.A.2.2.a. DNA nu

Dins dels sistemes de transferència no vírics, l'aproximació més simple que podem trobar és la utilització de DNA nu. Wolff i els seus col·laboradors van demostrar que hi havia expressió de gens marcadors en miofibres després d'injectar directament DNA en el múscul esquelètic (44). Tot i que els nivells d'expressió eren baixos, eren acceptables per a la vacunació i per això va créixer molt l'interès en les vacunes amb DNA, que generen respostes immunològiques antivíriques mitjançant la injecció intramuscular de plasmidis codificants d'antígens vírics. La injecció intramuscular de DNA també ha estat utilitzada per a l'expressió d'altres molècules farmacològiques, com ara la eritropoetina i la leptina (45). La pell, alguns tumors i algunes cèl·lules del sistema immunològic també són susceptibles de transferència gènica per DNA nu, de manera que la tècnica pot ser aplicada en teràpies antitumorals (46). Generalment, de la injecció intravascular de DNA nu en resulta una expressió gènica lleu en la majoria d'òrgans, tot i que de la injecció de grans volums (1,5-3 mL) en les venes portal o de la cua de ratolins en resulten nivells d'expressió més elevats, particularment en el fetge (47). S'han fet algunes aproximacions per millorar els nivells aconseguits amb la transferència de DNA nu, com ara el *gene gun* o bombardeig de partícules (48) i l'electroporació (49). Aquests procediments físics permeten al DNA travessar la membrana cel·lular i passar la via endosomes/lisosomes, amb la qual cosa s'evita la degradació enzimàtica. Recentment s'ha demostrat que la injecció intravascular de plasmidis sota pressió hidrostàtica dóna alts nivells d'expressió gènica en tots els músculs de l'extremitat tractada (50) i també en hepatòcits després d'una injecció a la vena de la cua o portal (47). A més a més, la melsa, el ronyó i altres òrgans també poden ser transfectats per DNA injectat intraparenquimalment o intravascularment sota pressió elevada (47). L'expressió aconseguida en els músculs o el fetge després d'injeccions intravasculares és similar a l'aconseguida amb vectors adenovírics. Recentment s'ha demostrat que els polímers que interaccionen dèbilment amb el DNA poden millorar l'eficiència de la transferència gènica per injecció intramuscular, ja que suposadament ofereixen protecció a la degradació enzimàtica (45). Tot i així, els polímers o lípids catiònics que interaccionen i condensen el DNA eficientment, tenen un efecte negatiu en

aquest tipus d'experiments. Com que la majoria de DNA nu injectat és degradat, sembla que un alt percentatge de DNA que contacta amb la cèl·lula és internalitzat i expressat eficientment. També es pot valorar l'elevada eficiència si es té en compte que *in vivo* s'aconsegueix transfectar el doble de cèl·lules amb la mateixa quantitat de DNA que s'utilitza per fer transfeccions *in vitro* amb lípids catiónics (51). Aquestes observacions, juntament amb el fet que *in vitro* el DNA no és actiu, suggereixen l'existència d'un mecanisme específic de captació de DNA *in vivo*. S'ha postulat que els àcids nucleics són incorporats per cèl·lules parenquimals *in vivo* per un procés actiu mediat per receptor (51). La coinjecció intravascular de DNA plasmídic amb un excés de polianions inhibeix la incorporació cel·lular i l'expressió d'aquest. S'ha comprovat que aquest efecte competitiu actua en l'entrada cel·lular i no afecta el transport nuclear. El fet que s'expressi exclusivament en les cèl·lules del parènquima dóna suport a la idea que la pressió no és responsable de l'entrada del DNA a les cèl·lules, a causa de processos com la generació temporal de porus en la membrana. Cal tenir en compte que, tot i que les pressions aplicades són altes (0,02-0,1 MPa), no ho són prou per provocar efectes negatius en altres processos cel·lulars com ara la dissociació de proteïnes oligomèriques, la inactivació de ribosomes i la desorganització del citoesquelet. En la incorporació d'oligonucleòtids hi han estat involucrats molts receptors, però cap ha demostrat ser necessari o suficient per dirigir aquest procés (52). Alguns d'aquests receptors podrien tenir un paper important en la incorporació de molècules de DNA més grans, ja que s'ha descrit la seva interacció. Una classe de receptors possiblement involucrats en aquest procés serien els receptors *scavenger* ja que són capaços d'unir una gran varietat de polianions, inclòs el DNA. De moment, cap dels receptors descrits dins d'aquesta classe concorda amb les dades experimentals que es tenen, però és molt possible que dins d'aquesta família hi hagi altres receptors que encara no hagin estat caracteritzats i puguin ser responsables d'aquest procés. La funció biològica d'aquests suposats receptors podria ser incorporar algun altre polianió o bé portar a terme una via específica d'incorporació de DNA, ja que són molècules que suposen una font nutritiva important.

1.A.2.2.b. Electroporació

La teràpia electrogènica implica l'aplicació d'un camp elèctric que indueix una reorganització estructural transitòria en la membrana cel·lular que pot ser utilitzada per permeabilitzar les cèl·lules i permetre la introducció de DNA. La permeabilització afecta bàsicament els fosfolípids i depèn bàsicament del nombre, la intensitat i la duració de les pulsacions elèctriques (53). L'efecte que s'aconsegueix és localitzat, ja que tan sols la part de la membrana tractada és competent per a la transferència plasmídica. S'ha demostrat que la presència del plasmidi en l'ambient cel·lular en el moment de l'aplicació de les pulsacions elèctriques és crítica en la transferència gènica. Aquesta tècnica és fàcil, segura, permet la introducció de diversos plasmidis sense limitació pel que fa a la mida del DNA i els costos associats són baixos. Cal, però, optimitzar el procés en funció del camp elèctric utilitzat i la

concentració de DNA, ja que concentracions elevades poden produir lisi cel·lular (53). La transferència electrogènica pot ser aplicada *in vitro* a diferents tipus cel·lulars en suspensió o en cultiu en monocapa (54) i en resulten eficiències comparables, o superiors, a les que s'obtenen amb lipofecció (55). L'electrotransferència es pot realitzar *ex vivo* o bé *in situ*, aplicant electrodes directament al teixit diana en el qual prèviament s'ha injectat el DNA plasmídic. D'aquesta manera han estat transfectats el fetge (56) i les cèl·lules de glioma (57) en rates i, també, tumors de mama (58) i les cèl·lules d'adenocarcinoma de còlon (59) en ratolí. La introducció de gens marcadors o, per exemple, del gen codificant pel factor de creixement de fibroblasts (FGF-1), ha donat expressions mantingudes durant nou mesos en músculs de ratolí, rata, conill i mico (60), o bé de sis mesos en ratolí en el cas del gen codificant de l'eritropoetina (49). Tot i això, aquesta tècnica presenta l'inconvenient de la falta d'especificitat, ja que totes les cèl·lules del teixit tractat amb el camp elèctric esdevenen permeables i, per tant, susceptibles d'incorporar el plasmidi que volem transferir.

I.A.2.2.c. Bombardeig de partícules

Aquesta tècnica, anomenada també *transferència biolística* (biològica + balística), va ser originalment utilitzada per dirigir gens a cèl·lules vegetals. En les aproximacions actuals, el DNA és precipitat sobre partícules d'or o de tungstè les quals són disparades cap a l'interior de les cèl·lules per un impuls d'heli (61). Les partícules d'or (1-5 μm de diàmetre) són suficientment petites per travessar la membrana cel·lular sense ocasionar danys importants i tenen la capacitat de transferir de 0,5-5 μg de DNA/mg d'or. Igual que en el cas de l'electroporació, hi ha manca d'especificitat, però no hi ha restriccions ni pel que fa al tipus cel·lular ni pel que fa a la mida de l'àcid nucleic, no hi ha risc d'immunogenicitat o toxicitat i els plasmidis poden ser reintroduïts en la cèl·lula tants cops com calgui. També seria una tècnica avantatjosa si es volguessin introduir al mateix temps gens codificats per diversos plasmidis.

El bombardeig de partícules ha estat molt aplicat al desenvolupament de vacunes de DNA (62) i particularment al tractament del càncer (63). Les teràpies antitumorals es realitzen *ex vivo* sobre les cèl·lules canceroses o bé *in situ* sobre la pell que recobreix el tumor, en la qual es transfereixen transgens codificants per antigens que en expressar-se estimulen la resposta de les cèl·lules T CD8+, responsables de restringir el creixement del tumor. Una aproximació alternativa és introduir citoquines recombinants, com ara el factor estimulador de colònies de granulòcits-monocits, interleucina-12 o interferó- α , a prop del tumor, per estimular la resposta immunològica (53). El *gen gun* és aplicat externament, de manera que les partícules penetren a través de l'epidermis i unes capes més intradèrmicament. Recentment, però, s'ha descrit la introducció biolística de DNA en el cor, en el fetge i en la còrnia (53).

1.A.2.2.d. Fosfat càlcic i DEAE-dextran

La precipitació amb fosfat càlcic i la transfecció amb dietilaminoetil (DEAE)-dextran són dos mètodes clàssics de transfecció *in vitro* que faciliten al DNA la seva unió i la seva entrada en cèl·lules en cultiu. A més a més, sembla que el fosfat càlcic protegeix el DNA de les nucleases presents en el sèrum i en l'espai intracel·lular (64). Les molècules de DEAE-dextran estan carregades positivament i interaccionen amb els fosfats carregats negativament de l'àcid nucleic. En els protocols inicials s'incubava el DNA i el DEAE-dextran i s'aplicava a les cèl·lules (65), però alguns protocols alternatius es basen en la incubació primer de les cèl·lules amb DEAE-dextran i després en l'addició del DNA (66). Sembla que els complexos DNA-DEAE-dextran són absorbits sobre la superfície cel·lular i internalitzats per endocitosi. Els avantatges d'aquesta tècnica són la seva relativa simplicitat i la reproductibilitat dels resultats. Com a desavantatges cal assenyalar els seus efectes citotòxics i el fet que l'eficiència de la transfecció disminueix en presència de sèrum. Aquest mètode és aplicable a cultius adherents o bé en suspensió, però la seva toxicitat fa que els protocols s'hagin d'optimitzar per a cada tipus cel·lular. El seu ús queda restringit a les transfeccions transitòries i no és recomanable per a l'obtenció de transfectants estables (67).

En canvi, la precipitació amb fosfat càlcic és un mètode adequat per a la producció de transfectants a llarg termini (68), encara que també és aplicable a expressions transitòries. La tècnica es basa a barrejar el DNA amb CaCl_2 en un tampó fosfat on es forma un petit precipitat que és dispersat per sobre del cultiu cel·lular (69). El principal desavantatge d'aquest mètode és la seva baixa reproductibilitat a causa de les variacions entre la mida i la morfologia dels complexos que es formen, les quals poden estar influenciades per petits canvis de pH en les solucions utilitzades en les transfeccions i també per la manera en que aquestes solucions són combinades (70)

Taula 3. Característiques dels sistemes de transferència gènica no vírics

Característica del sistema de transferència	DNA nu	Electroporació	Bombardeig de partícules	Fosfat càlcic i DEAE-Dextran	Sistemes lipídics	Polímers	Conjugats moleculars	Proteïnes químiques recombinants
Mida de la inserció/ Concentració vector	Sense límit	Sense límit	Sense límit	Sense límit	Sense límit	Sense límit	Sense límit	Sense límit
Via d'administració	<i>In vivo</i> *	<i>Ex vivo/In situ</i>	<i>Ex vivo/In situ</i>	<i>Ex vivo</i>	<i>Ex vivo/In vivo</i> *	<i>Ex vivo/In vivo</i> *	<i>Ex vivo/In vivo</i> *	<i>Ex/In vivo</i> *
Localització intracel·lular del vector	Episomal	Episomal	Episomal	Episomal	Episomal	Episomal	Episomal	Episomal
Expressió	Transitòria	Transitòria (fins a 9 mesos en múscul)	Transitòria (fins a 2 mesos en múscul)	Transitòria	Transitòria	Transitòria	Transitòria	Transitòria
Avantatges	Metodologia molt senzilla, es redueix al màxim la citotoxicitat, no hi ha resposta immunològica contra vector, possible introducció de diversos gens codificats en múltiples plasmidis	No hi ha resposta immunològica contra el vector, possible introducció de varis gens codificats en múltiples plasmidis	No hi ha resposta immune contra vector, possible introducció de varis gens codificats en múltiples plasmidis	Metodologia clàssica amb protocols molt ben establerts per diversos tipus cel·lulars.	Capacitat d'encapsidació controlada, possible incorporació de lligands específics, composició lipídica variable que permet incorporar funcions endosomolítiques, bona protecció de les molècules de DNA.	Possible incorporació de lligands específics, composició variable podent incorporar funcions endosomolítiques, bona protecció de les molècules de DNA.	Sistema dirigit a cèl·lules específiques per endocitosi mediada per receptor, base modular, possibilitat de ser totalment sintètics i evitar respostes immunològica.	Sistema dirigit a cèl·lules específiques per endocitosi mediada per receptor, base modular, producció més ràpida i senzilla que en el cas dels conjugats moleculars
Desavantatges	Procés inespecífic, poca eficiència de transfecció en teixits no musculars, manca de protecció del DNA a exonucleases	Manca d'especificitat per tipus cel·lular, manca de protecció del DNA a exonucleases.	Metodologia cara, manca d'especificitat per tipus cel·lular, manca de protecció del DNA a exonucleases.	Manca d'especificitat, citotoxicitat i baixes eficiències del DEAE-dextran en presència de sèrum, baixa reproductibilitat en el cas del fosfat càlcic.	Interacció amb proteïnes del sèrum, ràpida eliminació del plasma per cèl·lules fagocítiques, toxicitat sistèmica a elevades concentracions.	Interacció amb proteïnes del sèrum, elevades taxes de condensació provoquen la insolubilitat dels complexos.	Calen modificacions químiques en la seva producció que alenteixen i encareixen el procés	Estimulació del sistema immunològic en funció de la naturalesa de la proteïna química

* dins de les aproximacions *in vivo* també s'inclouen les realitzades *in situ*

I.A.2.2.e. Sistemes lipídics

El terme lipoplex ha estat recomanat pels experts (71) per referir-se al complex format per lípids i DNA. També s'han realitzat combinacions de lípids amb molècules de DNA unides prèviament a polímers, a partir de les quals es formen els complexos anomenats lipopoliplexos (71).

i. Liposomes neutres i aniònics

Els liposomes són vesícules microscòpiques esfèriques que es formen quan els fosfolípids que els componen s'hidraten i s'organitzen en forma de bicapa lipídica. Els primers estudis es van centrar en la utilització de liposomes neutres i aniònics, que es caracteritzen pel fet que les seves estructures queden inalterades un cop s'hi encapsida el DNA. En canvi, els liposomes catiònics (vegeu l'apartat ii) interaccionen amb el DNA a causa de les seves càrregues, i hi ha una reestructuració dels lípids durant la formació dels complexos. Els liposomes neutres i aniònics, han estat molt utilitzats com a transportadors de fàrmacs (72), però també com a vehicles de transferència de DNA, tot i que en aquest cas no han estat molt exitosos. La incorporació del DNA a aquests liposomes s'ha realitzat per diferents mètodes: evaporació en fase reversa, segrest Ca^{2+} -EDTA, diàlisi amb detergents, injecció d'èter i congelacions i descongelacions repetides (62). Però a causa del gran diàmetre hidrodinàmic del DNA i de la seva càrrega negativa, l'eficiència de l'encapsidació en aquests lípids és molt baixa. Altres limitacions que presenten són la seva baixa interacció cel·lular i la manca de capacitat d'alterar estructures endosòmiques. El 1987, Wang and Huand van augmentar una mica la seva eficiència utilitzant immunoliposomes sensibles al pH (73). Tot i que el rendiment era baix, es va demostrar l'existència de transferència específica *in vitro* i també en un model de tumor ascític (*ascites tumor model*). És important recalcar que els liposomes neutres o aniònics són menys tòxics i més estables en fluids biològics, cosa que és un avantatge en l'administració sistèmica del vector.

ii. Liposomes catiònics

Els liposomes catiònics formen fàcilment complexos amb el DNA, perquè interaccionen amb les seves càrregues negatives. Teòricament, no hi ha limitació pel que fa a la mida del DNA que es vol incorporar i aquest es recupera totalment en forma de complexos. Els liposomes catiònics ofereixen protecció al DNA davant de forces físiques i acció enzimàtica. La primera transfecció eficient que es va realitzar *in vivo* va ser descrita al 1987 per Felgner *et al.* (74) i a partir d'aleshores s'han realitzat noves formulacions de lípids catiònics (75). Els complexos entre liposomes catiònics i DNA es preparen en una relació determinada per tal que la càrrega neta

final sigui lleugerament positiva, de manera que propiciï la interacció amb les membranes cel·lulars carregades negativament. Tot i així, no és un procés generalitzable, ja que, per exemple, en casos d'injeccions intratumorals s'ha vist que la relació òptima entre el DNA i els liposomes correspon a una càrrega neta negativa i que quan s'augmenta la quantitat de lípid es redueix l'eficiència de l'expressió gènica (76). Cal tenir en compte també que la relació òptima entre el vector i el DNA no té perquè ser la mateixa *in vitro* que *in vivo*. La solució en la qual es preparen aquests complexos també és molt important, ja que afecta a la càrrega neta del complex, el seu volum i, per tant, la seva eficiència de transfecció. L'eficiència de transfecció d'un lípid depèn de la ruta d'administració, i, per tant, s'ha d'optimitzar el procés per a cada teràpia concreta. Les propietats físiques d'un lipoplex varien després de l'administració *in vivo* a causa de la interacció amb els fluids biològics. En una injecció intratumoral aquests canvis físics seran menors que en una injecció intravenosa. S'han utilitzat lipoplexos en diversos assaigs clínics per al tractament del càncer i de la fibrosi quística (77;78). En general, hi ha grans diferències en l'eficiència de la transfecció utilitzant diverses composicions de lípids, i és molt possible que això sigui a causa de la seva diferent interacció amb proteïnes del sèrum. Aquest efecte és força general, però la taxa d'interacció i la conseqüent desagregació dels complexos són força dependents de l'estructura dels lípids catiónics i els lípids *helper*. Altres problemes que sorgeixen davant del lliurament sistèmic són la ràpida eliminació dels lipoplexos per cèl·lules fagocítiques i la manca d'especificitat.

Algunes de les aproximacions que s'estan realitzant per optimitzar aquests sistemes consideren la modificació de la seva superfície per millorar la seva biocompatibilitat amb fluids biològics i la seva especificitat, juntament amb la incorporació de components actius que ajudin a superar barreres biològiques en la transfecció, un cop el vector ja ha arribat al teixit diana. Les injeccions intravenoses de lipoplexos donen lloc a expressió gènica en la majoria d'òrgans, com, el cor, els pulmons, el fetge, la melsa i el ronyó. D'aquests, el pulmó és el teixit que mostra els nivells d'expressió més elevats (79). També s'han realitzat injeccions intraperitoneals i administracions via respiratòria (62). La baixa eficiència aconseguida *in vivo* promou estudis sobre les barreres moleculars i cel·lulars implicades en el procés de transferència gènica i sobre les interaccions biològiques del vector amb la cèl·lula hoste. Travessar la membrana cel·lular representa la primera barrera que ens trobem en un procés de transfecció. Està acceptat que els lipoplexos són incorporats a la cèl·lula mitjançant un procés d'endocitosi, tot i que alguns estudis indiquen que el complex pot penetrar directament la membrana (45). A més a més, hi ha un estudi que demostra que l'entrada del DNA en les cèl·lules és relativament lenta (80). No s'han definit del tot les molècules amb les quals interaccionarien els lipoplexos, però sembla que els proteoglicans (PG) hi tenen un paper important, ja que les línies cel·lulars que en són deficientes són més difícils de transfectar (81;82). En aquest context cal indicar que una estratègia útil per obtenir un major rendiment és la unió (covalent o no) al lípid d'un lligand de reconeixement cel·lular (83). La segona

barrera en la transfecció cel·lular és la translocació del DNA plasmídic des dels endosomes al citoplasma, però la incorporació de pèptids o lípids *helper* fusogènics, com ara el lípid neutre *dioleoyl phosphatidylethanolamine* (DOPE), estimula la lisi endosòmica ja que desestabilitza la seva membrana. Els pèptids fusogènics són normalment solubles en aigua i tenen conformació *random coil* a pH fisiològic, però hi ha una transició a hèlix α amfipàtica en ambients àcids com el dels endosomes. S'ha demostrat que a pH àcids aquests pèptids esdevenen associats a les bicapes lipídiques i estimulen la fusió de petits liposomes de forma pH-dependent. Els lípids catiònics, però, també poden estimular l'alliberament del DNA gràcies a la seva capacitat com a detergents; s'ha especulat que alguns lípids catiònics, com el DC-colesterol (DC-chol), poden dissociar-se del vector quan assoleixen un estat totalment carregat en l'ambient acídic que hi ha en l'endosoma (62). Sembla, però, que el factor clau que acaba limitant aquest procés de transferència gènica és l'ineficient transport del plasmidi de DNA al nucli, procés dependent de la presència de senyals de localització nuclear (SLN). La incorporació de SLN augmenta l'eficiència de la lipofecció (84) però, a més a més, el transport al nucli també depèn de la mida del plasmidi, de la mateixa manera que la seva conformació també té un paper important: els plasmidis lineals són transportats més eficientment que altres conformacions plasmídiques. Recentment també s'ha demostrat que el DNA és transcripcionalment inactiu quan està acomplexat amb liposomes catiònics (80). Encara es desconeix el mecanisme pel qual el DNA és alliberat dels liposomes. Com a primera hipòtesi es va suggerir que en el nucli hi havia un intercanvi amb DNA genòmic (85), però recentment s'ha descrit que els complexos entre el DNA i els liposomes podrien dissociar-se per la interacció amb lípids aniònics, acumulats en el citoplasma de la cèl·lula per la desestabilització d'endosomes (86)

iii. Nous sistemes liposòmics

Gao i Huang (1996) van descriure que la incorporació de polímers catiònics, com ara la polilisina (PLL) a la barreja de liposomes catiònics amb DNA donava lloc a la formació de complexos més petits, que s'incorporaven a la cèl·lula i s'escapaven dels endosomes més eficientment (87). En la mescla dels complexos resultants hi havia una barreja heterogènia de poblacions que diferien entre si en la quantitat de lípids que tenien associats. Els que van mostrar un nivell d'activitat més elevat eren aquells amb un aspecte de partícules esfèriques compactes amb un diàmetre més petit de 100 nm. El «nucli» d'aquestes partícules es va tenyir fortament i va ser associat a DNA condensat per polilisinines que es trobava envoltat de bicapes lipídiques. Aquests lipopoliplexos van ser purificats i anomenats LPD-I. Posteriorment es va comprovar que la utilització de sulfat de protamina (*protamine sulfat*) en comptes de PLL millorava l'eficiència en la transferència gènica (88). Els LPD-I són eficients transfectant neurones després d'una injecció intracranial (89) i en general són capaços de transferir DNA a la majoria d'òrgans després d'una injecció intravenosa (90), però els nivells d'expressió més elevats es localitzen al pulmó. De

manera similar als lípids catiónics, les interaccions amb proteïnes del sèrum i, en definitiva, la eficiència dels LPD-1 estan condicionades per la composició d'aquests ja que, per exemple, la presència de DOPE fa que interaccionin amb més proteïnes del sèrum que no pas el colesterol (90).

Lee & Huang també han demostrat que es poden assolir nivells eficients de transfecció formant complexos amb el DNA i un policatió (com la poli-L-lisina) seguit de la interacció amb lípids aniònics que presenten un lligand d'unió cel·lular (91). Aquest nou vector, anomenat LPD-II, també manté un nucli de DNA condensat i un embolcall lipídic. La seva càrrega neta depèn de la relació entre el lípid i el DNA. En el cas dels LPD-II catiónics, la incorporació cel·lular no depèn del lligand d'unió cel·lular i no requereix utilitzar una composició lipídica sensible al pH. Si s'utilitza més quantitat de lípids aniònics en la seva composició, els LPD-II queden carregats negativament i aleshores adquireix més importància el reconeixement cel·lular mitjançant el lligand i la utilització de lípids sensibles a pH. Un dels principals avantatges dels LPD-II és la seva morfologia compacta, de manera que la seva preparació no ha d'anar acompanyada d'un procés de purificació. En comparació amb els primers lípids aniònics, en aquest cas el DNA és condensat més eficientment i pot ser incorporat als liposomes en quantitats molt més grans però s'estableixen més interaccions amb proteïnes del sèrum, de manera que es pot desestabilitzar la bicapa lipídica.

iv. Lípids no liposòmics

Els lípids no liposòmics presenten estructures micel·lars, en contrast amb les estructures de bicapes lipídiques pròpies dels liposomes. Contenen una part exterior hidrofílica i un nucli interior hidrofòbic i adopten diferents morfologies dependent de les molècules que conformen l'agregat. Aquests compostos apareixen en el camp de la transferència gènica a partir d'estudis recents en els quals es mostra que l'addició de surfactants com el Tween 80 a una emulsió catiónica preveu la formació de grans agregats (92). No es detecta cap efecte de les proteïnes del sèrum sobre aquesta emulsió ni cap símptoma de toxicitat addicional.

I.A.2.2.f. Sistemes basats en polímers

Els complexos formats per un polímer catiónic i DNA s'anomenen poliplexos (92). El primer sistema de transferència gènica basat en poliplexos estava compost per asialo-orosomuroid (AsOR)/polilisina-DNA (93), però posteriorment s'han desenvolupat molts altres tipus de polímers. A concentracions elevades, els polímers catiónics tendeixen a formar agregats amb el DNA i és necessari controlar la mida dels complexos, sobretot per aplicacions *in vivo*. Un estudi de Perales de l'any 1997 mostra que afegint a poc a poc polilisina a una solució concentrada de DNA i després NaCl, es poden preparar complexos petits de DNA i polilisina (94). En el primer pas es va afegint PLL fins que les càrregues de DNA estan

neutralitzades, de manera que no hi ha agregació intermolecular del DNA i es forma un nucli de condensació al llarg de l'àcid nucleic. Posteriorment, l'addició de NaCl facilita la solubilització dels complexos compactes que s'han format. Toncheva i els seus col·laboradors mostraven que els poliplexos basats en PLL combinats amb altres copolímers (PLL-gr-dextran, PLL-gr-PEG, PLL-gr-HPMA) són fins a tres vegades més solubles que els complexos formats amb homopolímers de PLL i que, a més a més, tendeixen a interaccionar menys amb biomolècules com ara les proteïnes del sèrum (95).

Els poliplexos també presenten els mateixos problemes que els lipoplexos. En concret, la majoria presenten limitacions pel que fa a l'alliberament citoplasmàtic del DNA després de l'entrada cel·lular. La transfecció cel·lular ha d'anar acompanyada d'un agent lític d'endosomes, com ara un adenovirus inactivat (96) o bé un pèptid fusogènic (97). També s'han utilitzat drogues lisosomotròpiques, com ara la cloroquina, per promoure l'alliberament citosòlic (98). Tot i així, podem trobar algun polímer, com ara el polietilenamina (PEI) i els dendrímers (polímers altament ramificats), que presenti mecanismes de desestabilització endosòmica (99). En el PEI i els dendrímers els àtoms de nitrogen es troben tan sols parcialment protonats en pH fisiològic (el pKa del PEI és de 5 mentre que és de 6,9 i 3,9 pels grups amino primaris i interiors dels dendrímers PAMAM), però el seu nivell de protonació augmenta en pH més baixos. Per tant, aquests polímers poden tamponar l'acidificació endosòmica amb la qual es troben després de l'endocitosis. La capacitat de tamponament que presenten aquests compostos en els endosomes provoca una acumulació massiva de protons i la conseqüent entrada d'ions clor. S'hipotetitza que l'inflament i el trencament final dels endosomes és a causa de l'entrada d'aigua com a conseqüència de l'increment net de la concentració iònica i a l'expansió del PEI i dels dendrímers per la repulsió interna de càrregues (62).

Complexos de DNA amb PEI lineal són eficients en transferència gènica després d'una administració sistèmica, en la qual la majoria d'òrgans són transfectats i el pulmó mostra el nivell màxim d'expressió (100). En canvi, l'isòmer ramificat de PEI mostra una baixa eficiència de transfecció després d'una administració sistèmica (100). L'eficiència de transfecció també està afectada per la longitud del polímer: en un principi, un polímer de cadena més llarga és més eficient en la condensació del DNA i ofereix més protecció davant de digestions enzimàtiques. Tot i així, cal tenir en compte que la sobrecondensació del DNA pot suposar dificultats per a l'alliberament del DNA al citoplasma.

A part d'obtenir una transferència gènica eficient, també cal que aquesta estigui dirigida a teixits específics. L'especificitat es pot incorporar o bé per promotors concrets o bé amb lligands o anticossos específics per al teixit o tipus cel·lular. La segona opció tindria dos avantatges: la reducció dels efectes tòxics en els teixits en els quals no es requereix la teràpia i l'increment de l'eficiència de transfecció perquè

es concentrarien sobre un determinat tipus cel·lular. Perquè el lligand-receptor tingui efecte cal que els complexos tinguin càrregues netes baixes.

S'ha demostrat que la substitució d'un 5% de PEI per galactosa dóna lloc a una transfecció selectiva d'hepatòcits pel reconeixement del receptor de l'asialoglicoproteïna (101). S'han acoblat al PEI molts altres lligands específics (102) que dirigeixen transfeccions selectives a neuroblastomes, melanoblastomes i línies cel·lulars provinents de leucèmies. També es va obtenir transfecció de cèl·lules epitelials amb PEI acoblat a motius de reconeixement d'integrines com ara el RGD (103).

Els polímers també han estat intensament estudiats en nanoesferes i microesferes com a transportadors de fàrmacs (104). Aquestes també ofereixen protecció al DNA, com altres sistemes de transferència gènica, i poden incorporar lligands específics. Recentment s'han desenvolupat i caracteritzat dos tipus diferents de nanoesferes: gelatina-DNA i quitosan-DNA. Aquestes són sintetitzades barrejant el DNA amb una solució aquosa que porta la gelatina o el quitosan. La formació de nanoesferes implica interaccions iòniques i també atrapament físic del DNA en les partícules. Les cèl·lules poden ser transfectades *in vitro* per aquestes partícules amb o sense un lligand de reconeixement específic, però l'eficiència de transfecció és relativament més baixa que en el cas dels lipoplexos o els poliplexos.

Últimament, en el camp de la teràpia gènica han estat introduïts polímers biocompatibles, que produeixen un alliberament controlat de DNA. El DNA nu encapsidat en micropartícules o microesferes de polímers biodegradables com ara el PLGA (poly(D,L-lactide-co-glycolide)) o l'EVAc (poly(ethylene-co-vinyl acetate)), va sent alliberat de manera bioactiva seguint un patró predictiu i controlat a llarg termini (diversos mesos) (105). Aquests tipus de sistemes presenten avantatges com ara la protecció del DNA just abans del seu alliberament, la transferència específica mitjançant l'ús de polímers implantables i l'alliberament a llarg plaç sense haver de donar administracions repetides.

I.A.2.2.g. Transferència gènica mediada per receptor

La transferència gènica mediada per receptor es basa en el fet que tipus cel·lulars diferenciats presenten receptors específics capaços d'unir i internalitzar determinats lligands. Aquest procés és la via natural d'internalització cel·lular utilitzada per agents vírics, microorganismes, toxines i macromolècules com ara nutrients cel·lulars, hormones i factors de creixement. Quan parlem d'endocitosis ens referim a tots aquells processos que desencadenen la internalització de regions especialitzades de la membrana plasmàtica i també petits volums de fluid extracel·lular (106). Hi ha bàsicament dos mecanismes d'endocitosis: l'endocitosis mediada per receptor, que és dependent de clatrina (*coated pit endocytosis*) i l'endocitosis independent de clatrina (107).

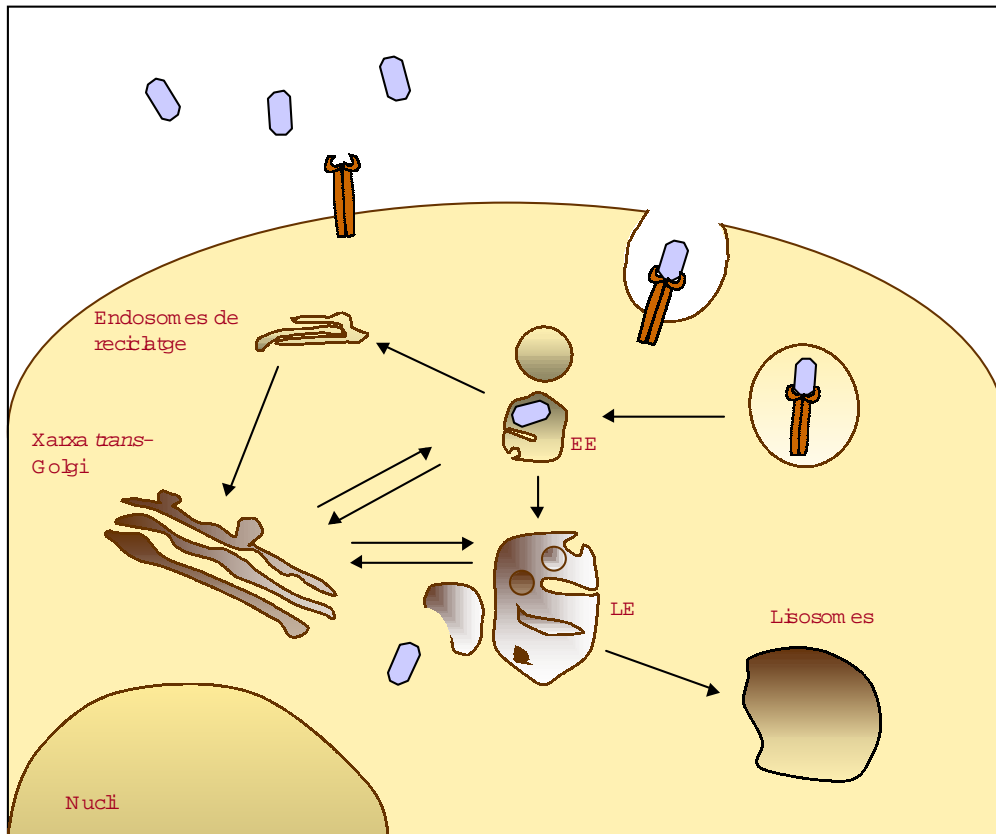


Figura 3. Transfecció cel·lular mediada per receptor. Les principals rutes de transport intracel·lular estan assenyalades amb fletxes. L'endocitosi, la selecció i el reciclatge dels components internalitzats via compartiments vesiculars inclou els *early endosomes* (EE), els *sorting endosomes* i els endosomes de reciclatge. El posterior atrapament i degradació de les molècules es produeix en els *late endosomes* (LE) i en els lisosomes, a excepció que aquestes presentin activitat fusogènica que els permeti escapar del compartiment vesicular i arribar a nucli.

L'endocitosi mediada per receptor dependent de clatrina implica la unió d'un lligand a un receptor cel·lular específic del qual en resulta l'agrupament de complexos receptor-ligand dins de *clathrin coated pits*. Gràcies a l'acció de la clatrina es produeix la invaginació dins la cèl·lula i finalment la creació de vesícules intracel·lulars revestides d'aquesta proteïna. Els mecanismes independents de clatrina (*uncoated pits*) són la fagocitosi, la pinocitosi i la potocitosi. La fagocitosi és un procés d'internalització de grans partícules i de microorganismes ($> 0,5 \mu\text{m}$). Aquest mecanisme és iniciat per receptors presents en la cèl·lula (fagòcit) que reconeixen directament la partícula que ha de ser fagocitada o bé indirectament a través de la seva opsonització (procés mediat per les opsonines, que són anticossos que s'uneixen a la partícula i la fan més susceptible de ser fagocitada). La seva internalització està mediada principalment per acció de pseudopodis. Els altres sistemes d'internalització que no utilitzen la clatrina es basen en la formació d'invaginacions a la superfície cel·lular i poden ser la pinocitosi (internalització de fluids i petites molècules mitjançant un procés similar al de la fagocitosi en el qual la cèl·lula emet prolongacions que engloben el material que es vol internalitzar), la

potocitosi (concentració i transport de petites molècules dins la cèl·lula) i la transcitosi (moviment de material des de l'espai extracel·lular apical fins a l'espai basal, per exemple en el cas dels endotelis capil·lars). Els dos últims processos poden utilitzar *caveolae* com a rutes d'internalització, en les quals les vesícules tenen un recobriment estriat en la seva cara citoplasmàtica que conté caveolina, una proteïna integral de la membrana (2). En cèl·lules no polaritzades, el material internalitzat es dirigeix als sortint endosomes i als early endosomes, en els que es realitzarà el seu reciclatge i la seva selecció. En aquests endosomes hi ha un pH baix (al voltant de 5,9 - 6) i això pot fer dissociar el receptor del lligand. Alguns receptors poden ser reciclats mitjançant petites vesícules que surten dels *early endosomes* en direcció a la membrana cel·lular o bé passen pel complex de Golgi i després són retornats a les membranes en la regió Trans Golgi. Aquests endosomes es converteixen en *late endosomes* a mesura que el pH va baixant. Vesícules provinents de la xarxa Trans Golgi i que són portadores d'enzims digestius també es fusionen amb aquestes estructures i alliberen el seu contingut, de manera que en aquests endosomes es degradaran moltes proteïnes i lípids. Com a últim pas, es produirà la fusió amb els lisosomes i es formarà un orgànul híbrid en el qual s'acabarà de degradar tot el material restant.

Totes aquestes vies endocítiques poden ser utilitzades com a mecanismes de transferència gènica. Dins dels vectors no vírics, els conjugats moleculars i les proteïnes quimèriques recombinants són dos sistemes que exploten aquest concepte per tal de transportar específicament àcids nucleics a un tipus cel·lular diana i alhora millorar la seva eficiència d'internalització cel·lular. Aquests vectors presenten avantatges molt importants com ara la seva capacitat potencial de transferir específicament el material genètic a determinats tipus cel·lulars, que no tenen limitacions pel que fa a la mida del DNA que s'ha de transferir, que el seu disseny pot ser realitzat de manera que es minimitzi el potencial de desencadenar reaccions immunològiques i respostes inflamatòries en l'hoste i, per acabar la seva naturalesa modular fa que siguin vehicles fàcilment optimitzables i adequables a noves aplicacions de teràpia gènica.

Algunes de les limitacions que han de superar els complexos vector-DNA abans d'arribar a la seva cèl·lula diana fan referència, per exemple, a la seva mida, ja que s'ha vist que les partícules de diversos centenars de nm de grandària no poden travessar barreres endotelials i epitelials (108). A més a més, algunes cèl·lules fagocítiques (com ara les cèl·lules fagocítiques de Kupffer en el fetge) s'encarreguen d'eliminar les partícules que són massa grans per travessar l'endoteli vascular. Si els complexos entre vector-DNA són administrats *in vivo*, cal que s'evitin les interaccions amb components del plasma (sals, lípids, carbohidrats, sistema del complement, enzims degradadors, etc.), ja que contribuirien a modificar les propietats fisicoquímiques dels complexos, tal i com també ha estat descrit pels lípids i polímers. Si es pretén transferir de manera específica el gen a un tipus cel·lular concret, també cal evitar les interaccions amb la matriu extracel·lular i amb

teixits no diana. Per acabar caldrà evitar possibles respostes inflamatòries i immunològiques. En introduir molècules estranyes en el cos es poden estimular respostes immunològiques específiques de tipus humoral i/o cel·lular. També hi ha respostes immunològiques no específiques, on s'inclouen la fagocitosi, la inflamació i altres mecanismes de resistència de l'hoste com ara el del sistema del complement (109). Aquesta resposta immunològica no específica és la principal barrera amb la qual es troben els complexos de DNA. La resposta inflamatòria, per exemple, és un dels principals problemes en els sistemes de transferència gènica ja que es dona independentment de la via d'administració i desencadena una major accessibilitat dels fagòcits a aquestes molècules foranes, per exemple retraient les cèl·lules endotelials i incrementant la permeabilitat capil·lar. Durant una resposta inflamatòria, els leucòcits, particularment els neutròfils i, en segon terme, els macròfags, migren fora dels capil·lars i es dirigeixen al teixit que els embolcalla. En el lloc de la inflamació, els fagòcits reconeixen les molècules foranes via receptors no específics presents en la seva superfície, de manera que s'hi poden unir i poden fagocitar-les. La unió és estimulada per opsonització, com la que porta a terme la molècula C3b del complement (tant els neutròfils com els macròfags tenen receptors que reconeixen específicament el component C3b) (2).

Hi ha una gran varietat de macromolècules, com ara les proteïnes, les lipoproteïnes, alguns àcids nucleics i molts polisacàrids que poden actuar com a immunògens en determinades condicions. Els complexos de DNA carregats positivament tenen l'habilitat d'activar el sistema del complement (110). Per exemple, l'activació del complement produïda per la polilisina és totalment dependent de la seva llargada i de la càrrega neta que presenti: cadenes molt llargues i l'elevada densitat de càrregues en la superfície activen més eficientment el sistema del complement. Cal tenir en compte que l'opsonització d'aquests complexos pot iniciar un seguit de processos del qual podria resultar l'eliminació dels complexos pel sistema immunològic. Per tant, el recobriment de càrregues positives amb altres materials, com podrien ser el PEG (110), inhibiria les interaccions amb el sistema del complement i disminuiria l'eliminació dels complexos del corrent sanguini.

i. Conjugats moleculars

Els conjugats moleculars són una nova generació de vectors no vírics que presenten diferents dominis funcionals conjugats químicament. Entre els més destacats trobem: 1) un lligand que dirigeixi la transferència cel·lular específica, 2) un domini d'unió a àcids nucleics basat en interaccions iòniques o altres interaccions dèbils, 3) un àcid nucleic portador del transgèn d'interès, com podria ser un plasmidi, 4) altres dominis que potenciïn la transferència gènica, com pot ser una seqüència de localització nuclear o un agent lític d'endosomes que propiciï l'alliberament del DNA al citoplasma cel·lular després del procés d'endocitosi. Un dels passos més importants en el disseny i la producció de conjugats moleculars és assegurar la unió entre els diferents dominis que componen aquests vectors, de manera que cadascun

mantingui les seves funcions. Es poden generar diferents tipus d'unions o de connexions. Entre d'altres, s'ha utilitzat la 1-ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl) carbodiimide (EDC) per formar unions covalents entre grups carboxil d'ASOR i grups amino de PLL (111), l'agent químic 3-(2-pyridyldithio) propiònic acid *N*-hydroxysuccinimide èster (SPDP) que converteix els grups amino-terminals en grups sulfhidril i ha estat utilitzat per unir transferrina a PLL mitjançant ponts disofre (112) i per acabar, la interacció entre biotina i estreptavidina també ha estat molt utilitzada, per exemple en el cas d'unions entre el factor de creixement de l'epidermis i PLL (113;114).

Agents d'unió a DNA

Cal que les molècules de DNA que es volen transportar siguin compactades de manera que no tan sols se n'asseguri la protecció, sinó que també es minimitzin les seves càrregues negatives, cosa que contribuirà a un procés de transferència més eficient. Com que la grandària i la càrrega dels complexos pot ser l'origen de la seva citotoxicitat, la seva antigenicitat i la seva insolubilitat, cal trobar un punt d'equilibri entre la seva mida i la seva estabilitat (115). Els agents d'unió a DNA han d'interaccionar amb el material genètic d'una manera reversible, no covalent i sense produir danys. S'han utilitzat elements que poden crear unions electrostàtiques amb les càrregues negatives dels grups fosfat del DNA, com ara els lípids catiònics, les lipopoliamines, els polications com polilisines (PLL) o polietilenamines, o histones, i per tant, poden donar lloc a la unió i la condensació de DNA en complexos de mides que poden ser incorporats per les cèl·lules (116;117). En la majoria de casos, però, l'element utilitzat per l'unió a DNA ha estat la polilisina, que ha donat lloc a complexos de forma toroïdal d'uns 80-100 nm (118). Complexos d'aquesta mida són incorporats fàcilment a les cèl·lules, ja que s'ha descrit que la mida mitjana dels endosomes és entre 100 i 200 nm (111;118). Alguns estudis amb agents policatiònics com ara la polilisina demostren que, tot i que la capacitat d'unir i compactar DNA augmenta a mesura que hi ha un nombre més elevat de grups catiònics, les cadenes d'uns 8 aminoàcids catiònics són les més adequades per obtenir una estructura de complex que sigui funcional en el procés de transferència mediada per receptor i que no desencadeni processos de citotoxicitat o d'insolubilitat (119;120). Cal tenir en compte, igual que en els sistemes lipídics, que si la càrrega neta del complex és positiva es crearan unions amb els fosfolípids de la membrana, per la qual cosa augmentarà l'eficiència del transport cel·lular mediada per les unions específiques del lligand cel·lular. És important també controlar la manera de preparar els complexos, ja que pot tenir implicacions en l'estructura final d'aquests. S'ha descrit la formació de conjugats de DNA-polilisina a elevades concentracions de sals, condicions en les quals es redueixen les unions electrostàtiques, i després disminuint la concentració de sals mitjançant diàlisi en tampons fisiològics, de manera que resulta en una formació controlada de complexos (121). D'altra banda, Wagner *et al.* descriuen la formació de complexos de transferrina-polilisina en tampons fisiològics sense fosfats i com a resultat també obtenen la formació

cinèticament controlada de complexos. També s'han utilitzat altres polímers catiónics, com ara poliarginines (122), les protamines (118) o l'HMG1 (123), i agents intercaladors com ara la bisacridina (124) o els dímers d'etidi (125). Tot i així, processos de transfecció amb l'ús d'intercaladors en absència de policondenciació no han estat eficaços ja que, tot i que existeix unió a DNA, no hi ha condensació.

Lligands dirigits a tipus cel·lulars específics

L'especificitat d'un vector s'aconsegueix mitjançant l'ús de lligands amb receptors que s'expressen en una població de cèl·lules específica. Un exemple d'aquest fet podria ser la glicoproteïna asialoorosomucoide (ASOR), que és específicament endocitada pel parènquima del fetge, ja que el seu receptor és quasi exclusivament expressat per aquestes cèl·lules (93). La transferrina té receptors en diferents tipus cel·lulars i ha estat utilitzada en conjugats moleculars dirigits a línies cel·lulars de fetge, de pulmó i eritroleucèmiques (112). Lligands com la transferrina presenten un avantatge, ja que la quantitat dels seus receptors pot ser modulada afegint, per exemple, desferroxamina, un quelant de ferro. D'aquesta manera el nombre de receptors es pot quadruplicar i això es tradueix en un increment en l'eficiència de transfecció (113). La sobreexpressió de receptors pel factor epidèrmic de creixement (EGF) en cèl·lules canceroses ha permès la incorporació específica de políplexos EGF/DNA a cèl·lules de càncer de pulmó (113). Més recentment s'han utilitzat també altres factors de creixement, com ara el factor de creixement de fibroblasts (126). La proteïna circumstzoide de la malària (MCS) s'ha incorporat per dirigir políplexos MCS/DNA específicament al fetge en condicions en les quals els hepatòcits presenten baixos nivells de receptor d'ASOR, com ara en cirrosi, diabetis

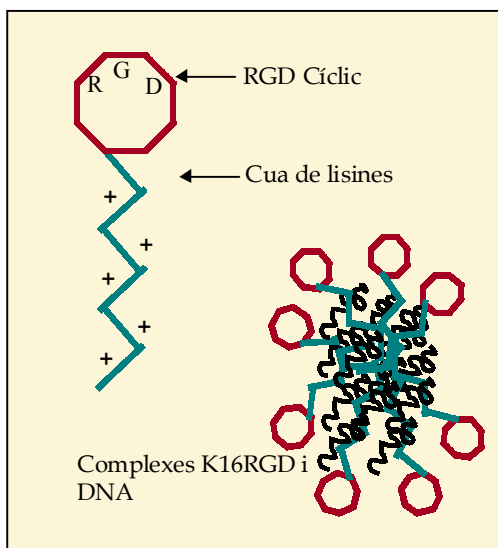


Figura 4. Conjugat molecular K16RGD basat en el peptid sintetic GGCRGDMFGCGG(K)₁₆ que inclou el motiu RGD com a domini de reconeixement d'integrines cel·lulars i una cua de 16 lisines com a domini d'unió a DNA. Hart S.L. *et al.* (1995) *Gene Therapy* 2: 552-554

i carcinomes hepatocel·lulars (127). També s'ha estat estudiant l'ús d'anticossos com a domini específic de reconeixement cel·lular, per exemple l'ús de l'anticòs anti-CD3 específic de cèl·lules T (128). Lligands més petits, com ara el folat, han estat utilitzats en conjugats moleculars per transferir DNA a cèl·lules que sobreexpressen els seus receptors, com ara les cèl·lules de carcinoma ovàric (129). En canvi, altres conjugats moleculars incorporen estructures proteiques funcionals més complexes, com ara càpsides víriques (130).

En altres aproximacions s'utilitzen peptids sintetics que reproduïxen nous lligands cel·lulars identificats, i fins i tot

trobem sistemes de transferència de DNA que es basen en l'acoblament de diferents pèptids sintètics amb funcions diverses. A vegades aquests també inclouen altres motius no peptídics que aporten funcions complementàries al conjugat, o bé ens trobem amb un únic pèptid que porta a terme totes les funcions bàsiques que es requereixen. S'han descrit diversos pèptids, un dels més destacats dels quals ha estat el basat en el motiu RGD. Aquest motiu va ser identificat en les proteïnes de la matriu extracel·lular i reconeix integrines de la superfície cel·lular (131;132). Pèptids que contenen motius RGD units a poli-L-lisina o a altres formulacions lipídiques milloren de manera substancial la transferència específica de plasmidis *in vitro* o *in vivo* (131) (vegeu la figura 4). Una altra aproximació ha estat la utilització de petits lligands com ara el glicòsid, dirigits principalment a hepatòcits, units covalentment a altres dominis funcionals (133). Tant *in vivo* com *in vitro*, els oligosacàrids units a polilisines potencien l'endocitosi en el fetge gràcies a la presència de receptors en hepatòcits que reconeixen pèptids galactosilats o manosilats (133).

Altres dominis que potencien la transferència gènica

L'aplicació d'agents d'alliberament endosòmic (vesicular) a un procés de transfecció ha demostrat que pot augmentar-ne l'eficiència. Els agents lisosomotròpics, el glicerol, les partícules víriques, els pèptids actius de membrana i algunes proteïnes presenten propietats de reorganització de membranes vesiculars, de manera que promouen l'alliberament de complexos DNA que queden atrapats en les vesícules postendocitosis. Els agents lisosomotròpics són amines poc bàsiques que poden inhibir específicament la funció lisosomal (134). Alguns exemples en són el clorur amònic i alquilamines dèbilment bàsiques, com ara la metilamina, la propilamina, la cloroquina, la procaïna i l'espermidina. La més utilitzada per potenciar processos de transfecció és la cloroquina (135) la qual s'acumula en el compartiment endosomal/lisosomal i produeix un efecte osmòtic, una vacuolització i el trencament de la vesícula. La seva eficiència depèn del tipus cel·lular i cal tenir en compte que el seu ús és limitat a causa de les seves propietats citotòxiques.

Diversos treballs descriuen la interacció del glicerol amb les membranes cel·lulars (136). Però com que tan sols amb glicerol no es produeix un procés de transfecció eficient, s'ha proposat que aquest no actua en la membrana cel·lular sinó en les vesícules intracel·lulars formades després de la internalització del DNA. Sembla, però, que el seu efecte està restringit a determinats tipus cel·lulars i que es troba influenciat per la càrrega neta dels complexos que es volen transferir i també pel domini d'unió a DNA que s'utilitza. S'ha detectat una acció combinada del glicerol i les polilisines sobre les membranes vesiculars en la potenciació de la transferència gènica (137).

Després de l'acidificació dels endosomes, les proteïnes de càpsides adenovíriques provoquen canvis conformacionals en la membrana endosòmica i alliberen el seu contingut al citoplasma cel·lular. Aquesta observació ha promogut la utilització

d'adenovirus en complexos DNA, cosa que ha donat lloc a increments de 100-1.000 vegades en l'expressió gènica (111). També s'ha vist que la utilització de rinovirus humans de la família *Picornaviridae* és eficient en l'alliberament vesicular de complexos DNA (138). La incorporació d'aquestes funcions víriques es pot aconseguir afegint de manera lliure l'adenovirus (actua en *trans*) o bé unint-lo directament al complex DNA. Un dels problemes més importants és que el complex també entrarà a la cèl·lula utilitzant el receptor de l'adenovirus i, per tant, es compromet l'especificitat cel·lular dels conjugats moleculars. S'han desenvolupat algunes estratègies per inhibir la internalització dels complexos per aquesta via, però tot i així encara hi ha altres factors negatius associats a aquests processos com ara la resposta inflamatòria i la immunogenicitat que desencadenen les partícules víriques.

El mecanisme de desestabilització de la membrana que duen a terme pèptids endosomolitics comporta la ruptura membranar o la formació de porus (139). Aquests pèptids són *random coils* que no presenten activitat lítica a pH 7, però que esdevenen endosomolitics a pH 5, perquè adopten conformacions hèlix α amfipàtiques que interaccionen amb la membrana per induir fusió i/o lisi (97). El pèptid més utilitzat és el que deriva de la seqüència aminoterminal de la subunitat HA2 de l'hemaglutinina del virus de la grip (140). Un altre pèptid amfipàtic és el GALA (141). S'ha demostrat que aquests dos pèptids incrementen l'eficiència de transfecció de complexos DNA-polilisina, DNA-pèptids, lípids catiónics, polietilenamina o poliamidoamina. Gottschalk *et al.* (142) (97) van dissenyar el pèptid sintètic JTS1 i que s'acobra amb si mateix per la seva cara hidrofòbica i és capaç de formar porus a un costat de la membrana endosòmica, de la qual en produeix el trencament. D'altra banda, el pèptid H5WYG també presenta activitat disruptora de la membrana, basada en la protonació de l'anell imidazol de la seva histidina (143). Aquests dos últims pèptids adopten estructures hèlix α a pH 7 i permeabilitzen les membranes a pH de 6,5 (143). Finalment, cal indicar que hi ha alguns sistemes de transfecció que no segueixen la via endocítica i, per tant, penetren directament en el citoplasma a pH neutre(144;145)

Per acabar, l'escapament també pot ser mediat per un transportador catiónic com ara el PEI, les lipopoliamines i les poliamidoamines, els quals tenen capacitat d'alterar membranes (vegeu apartat I.A.2.2.f)

A més a més de la capacitat d'escapar dels endosomes, també cal tenir en compte que hi ha una dependència de l'activitat mitòtica de les cèl·lules a causa de la inhabilitat de molts vectors no vírics de translocar el DNA plasmídic al nucli de cèl·lules que no es troben en procés de divisió. La membrana nuclear permet la difusió lliure de molècules petites, però aquelles que presenten una mida considerable (> 50 kDa) requereixen una seqüència específica de reconeixement nuclear (vegeu apartat de proteïnes quimèriques recombinants). En el procés d'importació, aquesta seqüència s'anomena senyal de localització nuclear (SLN). El

SLN del *large tumor antigen* (Ag T) del virus SV40 (PKKKRKV) és una de les seqüències més utilitzades en vectors no vírics (146). En el cas de proteïnes que porten un domini d'unió a DNA i un SLN, és possible que hi hagi una competició entre les dues seqüències, portadores de residus bàsics, per les molècules de DNA. En aquest cas, l'accessibilitat i la funcionalitat del senyal de localització nuclear s'incrementa utilitzant SLN neutres o aniònics o bé allargant les seves seqüències amb residus carregats negativament. També s'ha provat la unió covalent de SLN a molècules plasmídiques de DNA, de manera que es millora la seva accessibilitat nuclear (147). Cal destacar que un únic senyal dona bons resultats, però múltiples seqüències unides al plasmidi inhibeixen la seva translocació nuclear (148).

ii. Proteïnes quimèriques recombinants

Igual que en el cas dels conjugats moleculars, les proteïnes quimèriques recombinants són vectors constituïts per diferents dominis que aporten funcions rellevants en el transport específic del DNA. En aquest cas, però, es troben combinats en una sola cadena polipeptídica i això garanteix l'obtenció d'una proteïna modular transportadora de DNA mitjançant un procés de producció més ràpid, senzill i d'un cost més baix que en els basats en conjugacions químiques.

Unió al DNA: un prerequisit per a la formació dels complexos

Fins ara, en la construcció de proteïnes quimèriques recombinants s'han explotat algunes proteïnes que s'uneixen al DNA de manera natural, com poden ser les proteïnes estructurals nuclears (*nuclear structural proteins*). La condensació del DNA amb proteïnes nuclears no-histones, com poden ser les *high mobility group proteins* (HMG) 1 i 17 (149), i també amb proteïnes nuclears histones H1, H3 i H4 (150), ha demostrat ser suficient per transfectar cèl·lules en cultiu. En el cas de la histona H1 i l'HMG-1 s'ha demostrat que les concentracions baixes de Ca^{2+} faciliten l'alliberament del DNA al citosol, possiblement a causa de l'activitat fusigènica dels precipitats de fosfat càlcic (151). La galactosilació de la histona H1 dirigeix la formació de complexos que transfecten específicament cèl·lules que expressen el receptor de l'asialoglicoproteïna (152). En una altra aproximació similar s'ha dissenyat una molècula quimèrica que consisteix en el senyal de localització nuclear de l'antigen T del virus SV40 i de 95 residus del domini C-terminal de la histona humana H1, que forma complexos amb DNA i que, en presència de l'agent endosomolític cloroquina, transfecta cèl·lules en cultiu (153). També s'han utilitzat seqüències de reconeixement de DNA d'histones, com ara el domini d'unió a DNA inespecífic (SPKR)₄ derivat de la histona H1B (154). Chen *et al.* (155) van desenvolupar un sistema quimèric basat en un fragment Fab d'un anticòs específic per la proteïna gp120 del virus HIV que es trobava fusionat amb la protamina humana com a agent d'unió a DNA. En aquest estudi el vector va ser acomplexat amb un plasmidi portador d'una toxina bacteriana, de manera que les cèl·lules preinfectedes amb HIV incorporaven el vector i l'expressió del gen suïcida dirigia la

seva mort cel·lular. Alternativament, dominis d'unió a DNA derivats de factors de transcripció també poden ser utilitzats en aquest tipus de construccions. Diversos estudis han utilitzat el domini d'unió a DNA de GAL4, un activador transcripcional del llevat *Saccharomyces cerevisiae*. Els residus 2-147 de GAL 4 uneixen DNA d'una manera dependent de seqüència. Per tant, per a la formació del complex, el plasmidi DNA ha de presentar una o més còpies del motiu de reconeixement de GAL4 (156). Sabent que cada motiu és reconegut per un dímer de GAL4 es pot definir l'estequiometria DNA-proteïna pròpia del complex i controlar una mica més el procés d'incorporació cel·lular. Tot i que aquest domini uneix DNA portador de la seva seqüència de reconeixement eficientment, no porta a terme la condensació del material genètic, per la qual cosa és necessari afegir-hi un agent de condensació addicional, com ara polilisines (156). Paul *et al.* (157) van construir una proteïna multifuncional que presentava el domini GAL4 fusionat amb un domini d'unió i internalització de *Yersinia pseudotuberculosis* anomenat *invasina*. La proteïna GAL4/inv s'uneix al receptor de la *invasina* (integrina $\alpha_5\beta_1$) i al plasmidi portador del gen d'interès, que conté 8 repeticions de la seqüència de reconeixement de GAL4. Després de la condensació amb PLL es demostrava que els complexos transfectaven específicament les cèl·lules d'una manera dependent de receptor. També hi ha altres estudis que descriuen la utilització de GAL4 en combinació amb agents endosomolítics i altres lligands específics per a molècules de superfície de cèl·lules tumorals (158). Actualment s'estan investigant altres seqüències específiques d'unió a DNA, com ara el repressor LexA d'*E. coli* com a possibles dominis d'unió a DNA dins de noves proteïnes quimèriques multifuncionals (159).

Incorporació de lligands per a l'endocitosi mediada per receptor

La membrana plasmàtica restringeix la difusió passiva de macromolècules i partícules a les cèl·lules. Per tant, la incorporació de factors de creixement, anticossos, fragments d'anticossos o altres lligands específics no tan sols ofereix la possibilitat de dirigir la transferència del DNA a tipus cel·lulars concrets, sinó que també facilita la internalització de complexos via endocitosi mediada per receptor. Aquesta aproximació ha estat portada a terme amb un gran nombre de lligands dirigits a receptors que són comuns a molts tipus cel·lulars, com el cas de la transferrina, o bé amb d'altres limitats a algun tipus cel·lular, com en el cas de CD3 en limfòcits T (160). El receptor del factor epidèrmic de creixement (EGFR) és membre d'una família de receptors amb activitat tirosina quinasa. S'ha observat la sobreexpressió d'EGFR en un alt percentatge de carcinomes humans primaris, com ara els glioblastomes i els càncers de pulmó, de mama i de bufeta (161). Així doncs, l'EGFR és una diana apropiada per a l'aplicació de teràpies antitumorals. Es va construir una proteïna quimèrica anomenada TEG que consistia en TGF- α , que és el lligand natural de l'EGFR, fusionat genèticament a un domini de translocació bacteriana com a domini endosomolític i al domini d'unió a DNA de GAL4 (162). Després de formar els complexos amb el DNA i de la condensació posterior amb polilisines, s'observava que hi havia transferència gènica específica mediada per

l'EGFR. L'eficiència variava dependent del tipus cel·lular utilitzat, ja que en alguns casos calia addicionar-hi alguna altra activitat endosomolítica, com ara la de la cloroquina. També trobem altres proteïnes recombinants que basen el seu reconeixement cel·lular en toxines bacterianes, però a causa de que aquestes aporten funció de translocació al citosol a més a més d'interacció cel·lular, s'explicaran en el proper apartat.

Activitat endosomolítica

Després de la unió a receptors cel·lulars, els complexos vector-DNA entren en la via endocítica, de la qual s'hauran d'escapar per accedir al citosol. Per tal de millorar l'eficiència del procés es poden promoure activitats endosomolítiques mitjançant l'ús de reactius sintètics com ara la cloroquina, tal com s'ha fet amb altres tipus de vectors no vírics. En el disseny de proteïnes quimèriques recombinants també és pot explotar l'activitat endosomolítica de toxines bacterianes actives, com ara l'exotoxina A (ETA) de *Pseudomonas aeruginosa* o bé la toxina de la diftèria (DT) de *Corynebacterium diphtheriae*. També s'ha descrit l'ús de la toxina àntrax fusionada al domini d'unió a DNA de GAL4 (163). Un dels avantatges de les toxines bacterianes respecte a les proteïnes víriques és que en un sol polipèptid trobem diferents dominis funcionals que dirigeixen la interacció cel·lular, la translocació al citosol i l'activitat enzimàtica citotòxica. El domini de translocació és el que es troba involucrat en la funció d'escapament dels endosomes. La disminució de pH en les vesícules endocítiques indueix canvis conformacionals en aquest domini que fan que quedin exposades seqüències hidrofòbiques que s'insereixen en la membrana vesicular, la qual cosa produeix la formació de porus i el posterior alliberament del domini catalític al citoplasma (164;165). Hi ha un model en el qual s'hipotetitza que el domini catalític s'estén a través del porus (166), i en un altre es considera la possibilitat que la formació del porus afecti directament la integritat endosomica i resulti en l'alliberament del contingut luminal (159). Gràcies a la seva estructura modular, l'ETA i la DT poden ser fàcilment manipulades per introduir altres dominis heteròlegs que incorporin noves funcions i siguin adequades per a aplicacions terapèutiques. Per exemple, tan sols reemplaçant el seu domini natural de reconeixement cel·lular per lligands específics de cèl·lules tumorals, aquestes toxines han estat evaluades com a potents agents terapèutics antitumorals (167). També s'han enginyeritzat com a transportadors d'enzims i pèptids antigènics (168) A més a més, intercanviant els dominis enzimàtics de les toxines amb un domini d'unió a DNA i modificant el motiu de reconeixement cel·lular per lligands d'unió a cèl·lules tumorals, s'han construït proteïnes quimèriques que dirigeixen processos de transferència gènica de manera eficient gràcies als mecanismes naturals d'escapament d'endosomes d'aquestes toxines bacterianes (156;158). Per exemple, s'ha substituït el domini natural de reconeixement de la toxina ETA per un scFv recombinant que s'uneix específicament el receptor ErbB2 sobreexpressat en la superfície de diversos tumors cel·lulars d'origen epitelial (169;170). El domini C-terminal de la toxina també és substituït per un domini d'unió a DNA (aa 2-147 de

la proteïna GAL4), però es manté el domini central de translocació. La proteïna resultant no és tòxica i presenta el tropisme cel·lular redirigit i una nova funció com a transportador de DNA. Com en altres casos de vectors portadors del domini d'unió a DNA de GAL4, és necessària la incubació dels complexos amb PLL, ja que propicia la condensació del DNA i la protecció davant de DNases i aporta estabilitat al complex en contacte amb el sèrum.

També s'han descrit vectors recombinants basats en proteïnes víriques que dirigeixen la unió i l'entrada cel·lular alhora que actuen com a agents endosomolítics, com el cas del vector 3PO, basat en la *penton protein* de la càpsida de l'adenovirus del serotip 5 (171). El fet, però, que les proteïnes víriques presentin una unió cel·lular poc específica, fa que posteriorment s'hagi fusionat a aquest vector el domini d'unió al receptor de l'heregulin- α , el qual es troba sobreexpressat en algunes línies de càncer de mama (172).

Transport nuclear actiu

Després de la internalització cel·lular dependent de receptor i de l'alliberament dels compartiments endosòmics, els complexos arriben al citoplasma i allà han de superar la membrana nuclear, que serà l'última barrera que es trobaran abans que s'iniciï la transcripció cel·lular. En cèl·lules que estiguin proliferant, el DNA pot arribar al nucli d'una manera passiva després de la descomposició de la membrana nuclear durant la divisió cel·lular. Tot i així, *in vivo*, la majoria de les cèl·lules estan en repòs cosa que suggereix que l'import nuclear és el coll d'ampolla més important que hi ha en un procés de transferència gènica exitós (173).

Els complexos del porus nuclear (NPC) permeabilitzen la doble membrana de l'embolcall nuclear mitjançant la formació de canals aquosos a través dels quals té lloc el transport nuclear (53). El nucli estructural dels NPC o regió transportadora central és altament simètric, tot i que les regions perifèriques citoplasmàtiques i nucleoplasmàtiques són força diferents entre si (174). De la regió citoplasmàtica dels NPC surten vuit filaments curts que actuen com a lloc d'unió (*docking sites*) durant la importació o exportació mediada per senyals nuclears (174). En canvi, el costat nuclear dels NPC té una estructura de cistella que sofreix determinats canvis morfològics com a mínim en alguns processos d'exportació, com en el cas de grans ribonucleoproteïnes. Però, en general, els NPC són una estructura flexible i això podria tenir un paper important en el moviment de macromolècules a través seu (174). Aquests complexos permeten la difusió lliure cap a dins o cap a fora del nucli de macromolècules més petites de 45-50 kDa, però les molècules més grans requereixen un senyal específic de reconeixement que interaccioni amb la maquinària de transport nuclear. Per a la importació cal un senyal de localització nuclear (SLN) (174), i per a l'exportació (que no és el cas que es tracta aquí), un senyal d'exportació nuclear (SEN) (174). A més a més del canal central, s'han observat per microscòpia electrònica vuit canals d'uns 10 nm de diàmetre disposats

al voltant del perímetre dels NPC. La mida d'aquests canals està correlacionada amb la mida de les macromolècules que difonen a través dels NPC i per això s'han anomenat *canals de difusió*. Una hipòtesi apunta que la seva funció seria transportar petites molècules, com ara ions, mentre que les macromolècules més grans es transportarien a través del canal central dels NPC (174). Un NPC pot importar diferents molècules al mateix temps, les quals interaccionen amb diferents punts en el pas a través d'aquell (174). El diàmetre màxim que s'ha calculat perquè un substrat pugui passar per un NPC és d'uns 26 nm (175). És interessant destacar que aquest valor presenta variacions dependent de les espècies i de l'estat metabòlic de les cèl·lules estudiades. Per exemple, un cultiu confluent presenta un diàmetre exclòent més petit que en les cèl·lules que es troben en estat proliferatiu. No hi ha cap límit definit pel que fa a la longitud del substrat que ha de ser transportat, però si la longitud és considerable caldrà que presenti diversos senyals d'importació perquè es pugui translocar eficientment (176).

Els receptors per als SLN o SEN presenten homologia entre si i són considerats membres de la superfamília de les *karyopherin β/importines β* (177), amb l'excepció del receptor per als SLN clàssics o bàsics, que és la *karyopherin α/importin α*. Aquest reconeix el senyal del substrat i després forma un complex amb la *karyopherin β1* i s'uneix al NPC (174). Les nucleoporines representen un 5-10% de la massa del NPC i proveeixen llocs d'unió a les seqüències hidrofòbiques repetides (Phe-Gly) durant el trànsit a través del NPC. L'elevada afinitat de les importines β per aquests llocs permet la unió inicial del complex proteïna-SLN-importina a l'extrem distal de les fibril·les citoplasmàtiques del NPC (53). Aleshores, el complex és transferit al canal central i a través de diferents passos d'ancoratge amb les nucleoporines del NPC viatja 100-120 nm cap al costat nucleoplàsmic (53). S'han aïllat diferents proteïnes del NPC involucrades en el transport i totes presenten diverses repeticions d'aminoàcids, quaranta o més, les més freqüents de les quals són les seqüències GLFG o FXFGL (178). Aquestes nucleoporines amb alt contingut de repeticions d'aminoàcids podrien formar les vies que seguirien els substrats per passar a través del NPC. Encara no està definit exactament el paper d'aquestes repeticions d'aminoàcids, però sembla que no tots els llocs d'unió són iguals. De fet, la mateixa nucleoporina podria unir diferents proteïnes transportadores per diferents punts. D'aquesta manera, diferents substrats es podrien moure alhora en el NPC i podrien estar utilitzant diferents rutes de transport (174). Una proteïna molt important en molts processos de transport nuclear (però no en tots) és la proteïna-G Ran (179). La *Ran GTPase-activating protein* es troba en el citoplasma i, en canvi, el *Ran GTP-GDP exchange factor* (RCC1) es troba dins del nucli. Així doncs, es crea una situació en la qual la proteïna Ran-GTP és més abundant en el nucli i la forma RanGDP es troba en el citoplasma de manera que es crea un gradient de Ran GDP a Ran GTP a través del NPC. Un complex d'importació s'acobla en el citoplasma en resposta a RanGDP, es mou a través del NPC i es desacobla en el nucli com a resposta a la RanGTP. La via d'exportació funcionaria de la mateixa manera però a la inversa. La proteïna Ran

és reciclada contínuament, en la seva forma unida a GDP, pel seu factor de transport nuclear específic NTF2 (53). Hi ha, però, molts aspectes del transport nuclear que no

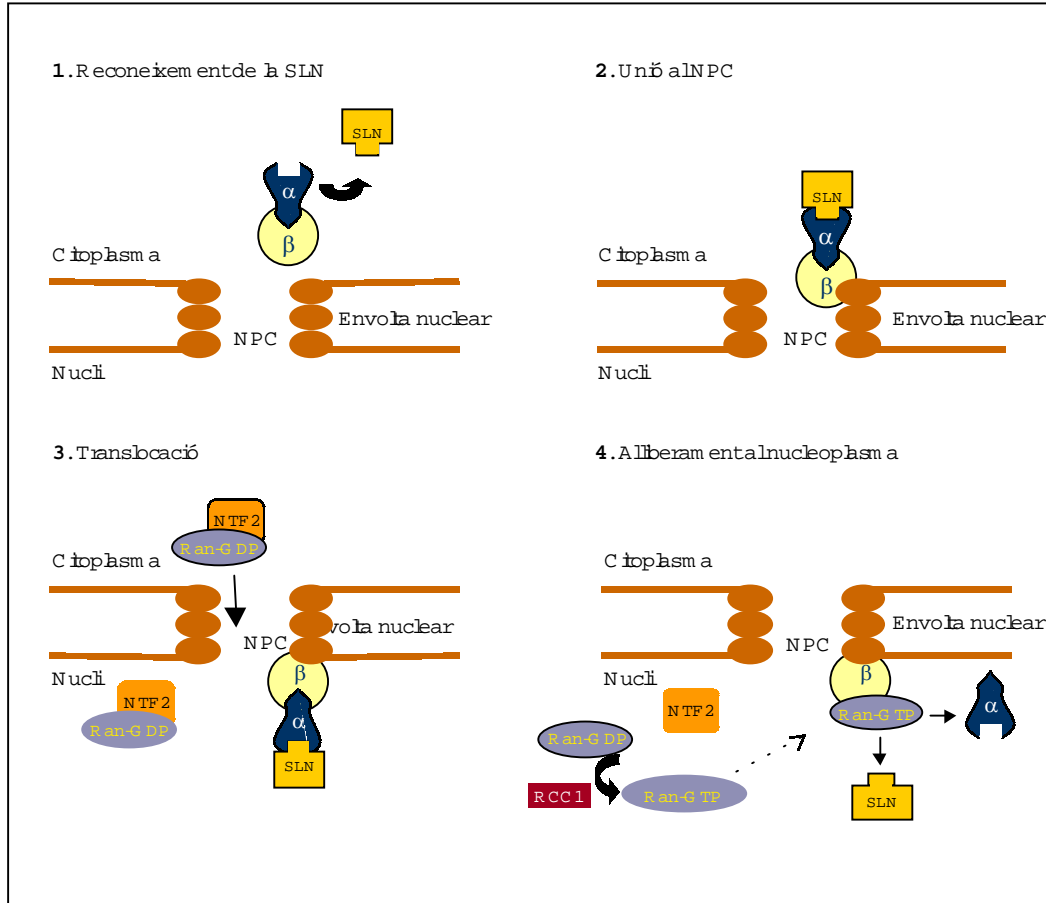


Figura 5. Importació nuclear dependent de les importines α/β i de la proteïna Ran. (1) Reconeixement del senyal de localització nuclear per l'heterodímer format entre les importines α/β mitjançant la interacció de la importina α amb la proteïna portadora del SLN. (2) Unió al complex del porus nuclear promoguda per l'afinitat cap a les seves nucleoporines. (3) Translocació de la membrana nuclear caracteritzada per una sèrie d'unions amb diverses nucleoporines del NPC. Paral·lelament a aquest procés la proteïna Ran-GDP és transportada a dins del nucli pel factor NTF2. (4) La proteïna Ran, en la seva forma unida a GTP, interacciona amb la importina β i dissocia el complex transportat, de manera que s'allibera la proteïna amb la SLN al nucleoplasma. Esquemes modificats de: Johnson-Saliba et al. (2001) *Current Drug Targets* 4 (2): 371-399.

están del tot ben entesos; entre d'altres, els requeriments energètics.

Els senyals de localització nuclear reconeguts per les importines α/β poden ser classificats en tres categories (taula 4). La primera correspon a seqüències que presenten una regió curta d'aminoàcids bàsics com ara el senyal de localització nuclear del antígen T del SV40 (126-PKKKRKV-132) (180). La segona està composta per SLN bipartits (181), que consisteixen en dues regions d'aminoàcids bàsics separats per 10 o 12 aminoàcids. La tercera classe que hi ha definida està composta

per SLN que presenten residus carregats o polars alternats esporàdicament amb residus no polars, del tipus de l'homeodomini de la proteïna de llevat Mat α 2 (182).

Tot i així, i tal i com s'ha esmentat anteriorment, està clar que la importació del SLN via importina α/β no és l'únic tipus d'importació de proteïnes al nucli. Per exemple sembla que SLN convencionals poden ser reconegudes de manera específica per la importina β 1 sola. Recentment s'ha demostrat que com a mínim hi ha 14 importines β diferents en eucariotes amb papers específics d'importació i també d'exportació per a algunes classes particulars de proteïnes (53).

A més a més, hi ha un grup de senyals de localització nuclear que no són reconeguts per importines i el procés de transport nuclear de les quals és independent de la proteïna Ran. L'exemple més conegut és la SLN del transactivador Tat del virus HIV-1 (183), que dirigeix proteïnes al nucli d'una manera dependent d'ATP però de manera independent de factors citosòlics (184).

Estudis *in vitro* indiquen que l'entrada de DNA nu al nucli depèn d'energia i pot ser inhibida per anticossos o per altres agents que perjudiquin l'acció de les nucleoporines, de manera que implica el NPC en la seva ruta d'entrada (53). S'ha demostrat que la importació és independent de factors citosòlics com ara les importines o la proteïna Ran, però el que sí que és cert és que l'eficiència del procés depèn de la grandària del DNA, ja que un fragment de 2 kb entra en el nucli amb una eficiència molt menor que no pas un DNA d'1 kb. Així doncs, és necessària la inclusió en el DNA de senyals de localització nuclear que aportin capacitat d'interacció amb la maquinària cel·lular d'importació nuclear i que incrementin l'eficiència del procés. La maquinària cel·lular implicada en el procés i l'estructura del NPC és la mateixa en diferents tipus cel·lulars, de manera que la SLN pot ser acoblada directament al DNA o bé a les molècules transportadores i pot ser funcional en diferents teixits (53).

El SLN de l'AgT de SV40 és un dels senyals més estudiats i caracteritzats (180). Ha estat acoblat a polilisina per procediments convencionals de *cross-linking* (185). Mitjançant estudis de localització en diversos sistemes però, s'ha vist que, un cop acomplexada amb el DNA, la polilisina no és reconeguda per les importines α/β (185). Però quan aquesta SLN de l'AgT es troba fusionada a un pèptid i aquest acoblat al complex de polilisina, hi ha un elevat reconeixement per les importines α/β (185). La mateixa SLN d'SV40 ha estat unida no covalentment a plasmidis DNA via *peptide nucleic acid* (PNA) amb la qual cosa s'han millorat considerablement els processos de transfecció (186). En altres aproximacions, pèptids acoblats a la SLN de SV40 eren units a DNA lineal portador del gen marcador que portava unit a l'altre extrem un *hairpin oligonucleotide* per prevenir la degradació per exonucleases. S'observava, utilitzant diferents vectors catiònics, un augment de l'eficiència de l'expressió gènica de 10 a 1.000 vegades (187). Com alternativa a la polilisina s'utilitza el domini d'unió a DNA GAL4, que també conté un senyal de localització

nuclear entre els aminoàcids 1 i 29. Dades recents d'assaigs d'unió *in vitro* suggereixen que aquest SLN del GAL4 interacciona directament amb la importina β , de manera que desapareix l'activitat d'unió a DNA pròpia de la proteïna (188). Com a conseqüència, els complexos GAL4/DNA es dissocien abans d'arribar al nucli a causa de la competició per l'excés d'importina β . S'ha demostrat recentment que la utilització de polilisina unida a la SLN de l'AgT de SV40 permet als complexos GAL4/DNA ser reconeguts amb elevada afinitat per les importines α/β , cosa que ha permès millorar l'eficiència *in vitro* i *in vivo* (189).

Tots els SLN que trobem a la taula 4, poden ser bons candidats per utilitzar en sistemes de transferència de DNA. El domini BIB, per exemple, es troba present en moltes proteïnes ribosòmiques i seria un candidat excel·lent perquè és reconegut per 4 importines diferents (190) i podria mediar processos d'importació nuclear de DNA amb una eficiència elevada. Una altra alternativa seria la utilització de proteïnes d'*Agrobacterium tumefaciens*. Aquest bacteri transfereix eficientment DNA com un complex de nucleoproteïna a cèl·lules vegetals i és molt utilitzat per transformació de plantes. Les proteïnes virulentes d'*Agrobacterium*, anomenades VirD2 i VirE2, tenen funcions molt importants en aquest procés. S'ha demostrat que els complexos que consisteixen en una cadena senzilla de DNA i proteïnes recombinants VirD2 i VirE2 són transportats eficientment al nucli de cèl·lules de mamífer en un procés dependent del senyal de localització nuclear present en VirD2(191)

Taula 4. Exemples de senyals de localització nuclear. Taula modificada de Johnson-Saliba *et al.* (2001) *Current Drug Targets* vol.2, núm.4: 371-399.

Classe	Proteïna	Seqüència diana	
SLN Convencionals reconegudes per importines $\alpha/\beta 1$ i importació nuclear dependent de Ran	SLN tipus ag-T	SV40 Ag-T	PKKKRKY ¹³²
		Ad5 Ela	KRPRP ²⁸⁹
		SV40 VP2/3	PNKKKRY ³²³
		Dorsal	RRKRQR ³⁴⁰
		c-rel	KAKRQR ²⁹⁴
		NF- κ B p65 (RelA)	EEKRKR ²⁸⁶
		LEF-1	KKKKRKRKREK ³⁸²
	SLN bipartides	SW15	KK - espaiador de 10 aa - RKRGRPRK ⁶⁵⁵
		Rb	KR - espaiador d'11 aa - KCLR ⁸⁶⁹
		xnf7	KRK- espaiador de 8 aa - KKAKV ¹²¹
		Receptor de Glucocorticoide humà	Rk - espaiador de 10 aa - RKTCK ⁴⁹⁵
		Nucleoplasmina	KR - espaiador de 9 aa - KKKKL ¹⁷¹
		N1N2	RKKRK - espaiador de 12 aa - KSK ⁵⁵¹
	SLN tipus Mato2	Mato2	MNKIPIKDLLNPQ ¹³ VRILESWFAKNI ¹⁵⁹
		MyoD	VNEAFETLKRC ¹³⁵
NP del virus de la grip		AAFDELRLVLS ³⁴⁵	
SLN reconegudes per importines β i importació nuclear dependent de Ran	Reconegudes per importines $\beta 1$	PTHrP	YLTQETNKVETYKEQPLKTPGKKKKGK ⁹⁴
		TCPTP	EKRIREDRKATTAQKVQQMKQRLNENERK ³⁸¹
		HIV-1 Rev	RQARRNRRRWR ⁴⁶
		HTLV Rex	MPKTRRRPRRSQRKPPT ¹⁸
	Reconegudes per importines $\beta 2$ (tipus M9)	hnRNP A1	NQSSNFGPMKGGNFGGRSSGYPYGGGGQYFAKPRNQG GY ³⁰⁵ (M9)
		y Nab2p	TQRGGAVGKNRRGGRGGRNRRNNSTRFNPLKAL G ²⁵⁴
	Reconegudes per altres importines β	rpL23a	VHSHKKKKIRTSPFTTPKTLRLRRQPKYPRKSAPRRN KLDHY ⁷⁴ (BIB)
		rpL25	MAPSAKATAAKKAVVKGTVNGKKALKVRTSATFRLPK TLKLAR ⁴¹
	Reconegudes per importines $\beta 3$	Pho4	SANKVTKNKSNSPYLNKRKKGKPGPDS ¹⁶⁶
	SLN no reconegudes per importines i independents de Ran	HIV-1 Tat	GRKKKRRQRRRAP ⁵⁹
hnRNP K		YDRRGRPGDRYDGMVGFSADETWDSAITWSPSEW QMAV ³⁶¹ (KNS)	

ANTECEDENTS DEL TREBALL DE RECERCA

I.A.3.ENGINYERIA DE PROTEÏNES I ANTECEDENTS DEL GRUP

L'enginyeria de proteïnes és el disseny, la producció i l'anàlisi de les proteïnes que han estat modificades i alterades. Aquesta disciplina ha permès aprofundir en el coneixement de la funció i l'estructura proteica, així com millorar el disseny i la construcció de noves molècules amb una finalitat terapèutica, diagnòstica i industrial. Per poder obtenir noves proteïnes amb una funció desitjada és necessari estudiar els mecanismes mitjançant els quals una seqüència lineal d'aminoàcids determina una estructura tridimensional, el plegament proteic i les relacions que existeixen entre la seva estructura i la seva funció. Per aprofundir en aquest estudi, el coneixement de l'estructura tridimensional d'una proteïna és una eina molt valuosa, perquè permet realitzar modificacions estructurals i portar a terme una anàlisi posterior de la contribució de diferents residus de la molècula a la seva funció i la seva estructura.

Les principals eines utilitzades per alterar l'estructura d'una proteïna són la mutagènesi dirigida, introducció de petits canvis de nucleòtids mitjançant tecnologia de DNA recombinant, i la mutagènesi a gran escala, en la qual es realitzen fusions, insercions, substitucions o delecions de fragments polipeptídics. També es pot portar a terme mutagènesi a l'atzar, de manera que s'obté una llibreria de mutants i d'aquests se selecciona el que presenta les característiques d'interès.

Entre les diverses aplicacions de l'enginyeria de proteïnes, s'ha aconseguit allargar la vida mitjana de molècules com l'activador del t-plasminògen, una forma truncada del qual és més estable que la proteïna salvatge (192), millorar processos de producció de proteïnes com la IL-2, en la qual una disminució del nombre de cisteïnes incrementa la producció de la seva forma correctament plegada (192), millorar l'estabilitat tèrmica i a solvents orgànics d'enzims molt utilitzats en indústries químiques (193), facilitar processos de purificació proteica (194;195), humanitzar anticossos de ratolí mitjançant la fusió de dominis constants d'humans a dominis variables de ratolí, amb la qual cosa s'aconsegueix reduir la regió immunogènica i retenir l'especificitat (192), seleccionar noves molècules amb patrons d'afinitat millorada mitjançant processos de *phage display* (196) i produir molècules biespecífiques, com ara la IL-2 (part de reconeixement específic)

fusionada amb la toxina de la diftèria (domini efector citotòxic) (192) mitjançant la unió de diferents dominis heteròlegs.

L'enginyeria de proteïnes ha estat la principal eina de treball del nostre laboratori; s'ha realitzat enginyeria d'anticossos i presentació de pèptids heteròlegs en enzims i bacteriòfags aplicats al disseny i millora d'antígens i al desenvolupament de biosensors moleculars. Alhora, s'han estudiat i millorat els processos de producció de proteïnes recombinants utilitzant *Escherichia coli* com a fàbrica cel·lular.

Els antecedents d'aquest treball es basen en estudis de presentació del pèptid GH23, de 23 aminoàcids, el qual reproduïx la seqüència del llaç G-H de la proteïna VP1 del VFA (Virus de la Febre Aftosa), en l'enzim β -galactosidasa d'*Escherichia coli*. Amb la presentació de pèptids es pretén reproduir les característiques funcionals d'un fragment polipeptídic un cop unit aquest a la superfície d'una proteïna portadora, un virus o un microorganisme recombinant. Per aconseguir-ho cal reproduir amb la màxima fidelitat possible l'ambient del qual procedeix el fragment. Per a això, cal buscar llocs d'inserció en zones de la proteïna portadora exposades al solvent que permetin reproduir les característiques fisicoquímiques originals i cal evitar les zones que suposin restriccions estructurals. També cal buscar llocs permissius dins de la proteïna presentadora que tolerin insercions sense patir alteracions importants en la seva funcionalitat i la seva estabilitat. Les quimeres resultants reuneixen les funcions de la proteïna portadora i del pèptid presentat i s'utilitzen principalment com a immunògens en la producció de vacunes (197) i la detecció de determinats compostos (198). Cal assenyalar el seu ús recent com a biosensors moleculars. En aquest procés es produeixen canvis en les propietats físiques de la macromolècula a causa de la unió amb el seu lligand, cosa que es tradueix en un senyal macroscòpic que permet detectar-los.

En el nostre laboratori, Benito i els seus col·laboradors van generar per mutagènesi dirigida una sèrie de seqüències de restricció dins del gen *lacZ* per poder inserir oligonucleòtids que codifiquessin pel pèptid víric intentant identificar per mètodes de predicció i d'assaig-error regions permissives a aquestes insercions. Un cop resolta l'estructura tridimensional de la β -galactosidasa (199), s'han pogut seleccionar amb major precisió nous llocs d'inserció (200). Els llocs permissius identificats per a la inserció del pèptid GH23 han estat entre les posicions 249-250, 275-276, 278-279, 581-582, 772-773, 795-796, juntament amb les fusions en els extrems aminoterminal i carboxiterminal. L'enzim pot, a més a més, tolerar la presència de fins a tres còpies del pèptid per monòmer sense perdre la seva activitat. En alguns casos, les proteïnes són capaces de reproduir l'antigenicitat del llaç G-H en el virus intacte millor que el pèptid viral acoblat a hemocianina (201;202). La unió d'anticossos al pèptid inserit pot incrementar l'activitat d'alguns enzims recombinants des d'un 150% a un 300% segons el mutant. Aquest augment és dependent del títol i no s'observa quan s'incuben proteïnes amb anticossos dirigits contra la β -galactosidasa o altres proteïnes. La presència de llocs permissius dins de

la β -galactosidasa i el fet de poder modular la seva activitat amb la unió d'anticossos en el fragment inserit, obren la possibilitat de l'ús d'aquestes quimeres com a biosensors moleculars, en aquest cas d'anticossos específics contra el VFA. A més a més, es va comprovar que les β -galactosidasa presentadores d'aquests pèptids podien unir-se a cèl·lules de mamífer (203), ja que el llaç G-H està implicat en la unió a integrines cel·lulars a través del motiu RGD i d'alguns residus flanquejants identificats en la seva estructura cristal·logràfica (204). Assaigs de competició van indicar que aquesta unió cel·lular era dependent del pèptid GH23 i que es realitzava bàsicament a través dels receptors de vitronectina ($\alpha_v\beta_3$, $\alpha_v\beta_5$) i, en una proporció menor, a través dels receptors de la fibronectina ($\alpha_5\beta_1$).

I.A.4.L'ENZIM β -GALACTOSIDASA COM A PROTEÏNA PORTADORA

L'enzim β -galactosidasa d'*Escherichia coli* (β -D-galactòsid galactohidrolasa, E.C.3.2.1.23.), codificat en el gen *lacZ*, està format per quatre subunitats idèntiques de 116.353 Da cadascuna i unides no covalentment (199), tot i que pot presentar formes agregades de 8, 16 i més monòmers (205). Existeixen dues zones de contacte entre els monòmers, les quals han estat anomenades *long interfase* i *activating interfase*, ja que en aquesta última és on es localitza el centre actiu de l'enzim.

L'enzim β -galactosidasa catalitza la hidròlisi de l'enllaç β 1-4 de la lactosa amb la qual cosa es produeix glucosa i galactosa, de manera que les cèl·lules poden utilitzar aquest sucre com a font de carboni (206). També catalitza la isomerització de la lactosa (galactosil- β -D-(1,4)-glucopiranos) a alolactosa (galactosil- β -D-(1,6)-glucopiranos), principal inductor de l'operó *lac* d'*E. coli* (207).

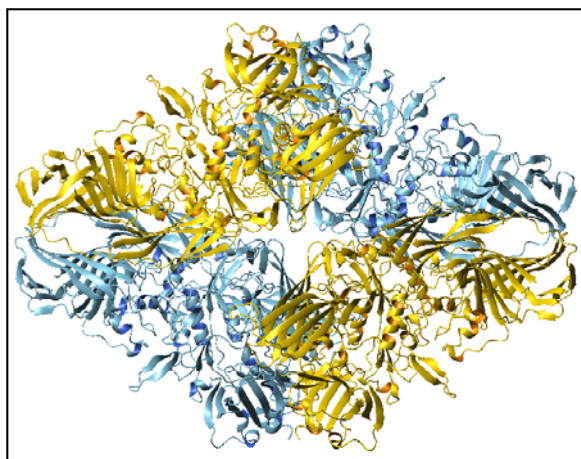


Figura 6. Estructura tridimensional de la β -galactosidasa segons coordenades de Jacobson *et al.* (1994).

Mitjançant tècniques de mutagènesi dirigida s'han pogut determinar els aminoàcids clau en la catàlisi: Glu-461 (208), Tyr-503 (209), Glu-537 (210) i His-540 (211). La Gly-794 ha estat també descrita com a punt d'unió al substrat (212). Cada subunitat té, a més a més, un lloc d'unió a Mg^{2+} o Mn^{2+} , que, tot i que no és indispensable per a la seva activitat, augmenta significativament la velocitat de reacció per a la majoria de substrats. També pot ser activada amb Na^+ o K^+ .

Hi ha determinades formes inactives de la β -galactosidasa que presenten complementació, de manera que, en ser incubades amb altres fragments polipeptídics, recuperen la seva activitat (213). En l' α -complementació, la forma M15 de l'enzim presenta una deleció dels primers 50 residus i, en ser incubada amb el pèptid α , recupera l'activitat que havia perdut. En l' ω -complementació, la deleció és a l'extrem carboxil i correspon gairebé a una tercera part de la seqüència del gen *lacZ*.

La β -galactosidasa també pot hidrolitzar altres compostos anàlegs a la lactosa de manera que donarà productes de color fàcilment identificables mitjançant visualització *in situ* i quantificables mitjançant espectrofotometria. Entre els compostos més utilitzats cal destacar l'ortonitrofenil- β -D-galactopiranosid (ONPG), que dóna un producte de color groc, el vermell de clorofenol galactopiranosid (CPRG), que dóna un producte de color vermell, i el 5-bromo-4-cloro-3-indolil- β -D-galactopiranosid (X-gal) que dóna un producte de color blau. Aquesta característica ha fet que es desenvolupessin assaigs enzimàtics ràpids, senzills i fàcilment mesurables (214) i que la β -galactosidasa hagi estat àmpliament utilitzada en el seguiment i el control de molts processos biològics. També han estat molt utilitzades β -galactosidasas modificades amb fusions i insercions, ja que l'aparició a principis dels anys vuitanta de vectors amb múltiples llocs de clonatge en l'extrem 5' del gen *lacZ* (215) va permetre la creació de moltes proteïnes de fusió amb β -galactosidasa, les quals han estat utilitzades per exemple en el seguiment de la producció de proteïnes recombinants en bioreactors (215) i en la millora de l'estabilitat de proteïnes heteròlogues, reduint la seva toxicitat (216) o bé incrementant la seva producció (217). No sempre, però, s'aconsegueix aquest objectiu, i a vegades aquestes proteïnes recombinants són proteolitzades. En la majoria de casos, la degradació d'aquestes proteïnes dóna lloc a un primer fragment estable d'uns 90 kDa anomenat *fragment B* (218). La sensibilitat de les proteïnes β -galactosidasa recombinants sembla que depèn de la massa molecular del pèptid fusionat i de les pressions conformacionals que exerceix aquest fragment heteròleg sobre l'estructura global de la molècula, ja que aquests poden arribar a afectar les vies de plegament (219).

Per acabar cal indicar que el desenvolupament de mètodes de purificació usant substrats no hidrolitzables de la β -galactosidasa (220) ha simplificat els processos de separació i ha facilitat l'obtenció pràcticament pura de l'enzim sol o fusionat amb altres proteïnes que poden ser posteriorment separades per proteases específiques (221).

I.A.5.EL LLAÇ β G- β H DEL VIRUS DE LA FEBRE AFTOSA

El virus de la febre aftosa (VFA) és l'únic representant del gènere *Aphthovirus* de la família *Picornaviridae*. És l'agent responsable de la febre aftosa o glossopeda, malaltia que afecta els animals fisípedes domèstics (porcs, cabres, bòvids i ovelles) i salvatges (cèrvols, óssos, elefants, etc.) i que produeix lesions vesiculars o aftes en mucoses i en determinades zones epitelials. Aquesta malaltia presenta una taxa de mortalitat baixa en animals adults (inferior a un 5%), però en animals vells o molt joves la mortalitat pot arribar fins a un 50%, generalment per lesions cardíaques irreversibles (222). Tot i així, la febre aftosa provoca grans pèrdues econòmiques a causa de una taxa de morbiditat propera al 100% i als efectes directes de la malaltia, caracteritzats per una disminució de la producció de llet i del pes corporal dels animals durant diverses setmanes després de la infecció. Existeixen set serotips diferents : A, O, C, ASIA, SAT1, SAT2 i SAT3, i cada serotip inclou un gran nombre de variants i subtipus.

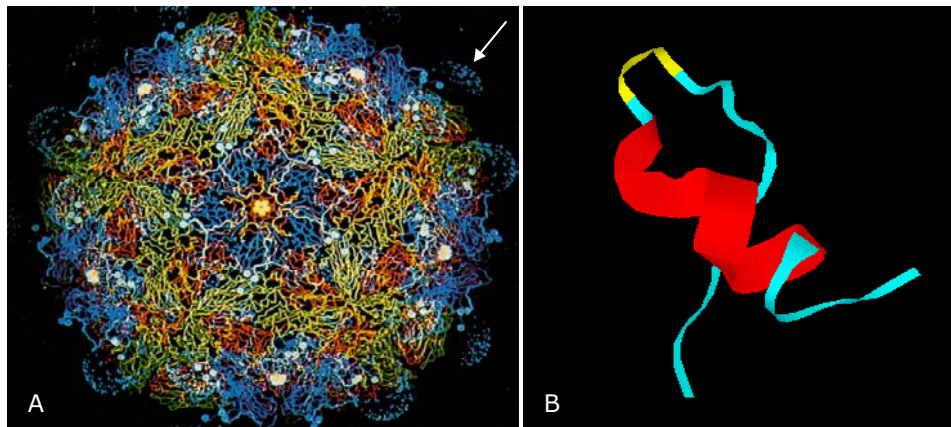


Figura 7. (A) Estructura tridimensional del VFA, serotip O (Archarya R. *et al.*, 1989). La càpsida vírica està vista des del eix de simetria pentamèrica. La proteïna VP1 es mostra en blau, la VP2 en verd, la VP3 en vermell i la VP4 en groc. Les esferes puntejades, assenyalades amb la fletxa, defineixen la posició aproximada del llaç β G- β H ja que en aquest cristall no queda resolta la seva estructura tridimensional. (B) Estructura del pèptid sintètic A15, que reproduceix un segment del llaç β G- β H, unit a l'anticòs monoclonal SD6 segons coordenades de Verdaguer *et al.* (1995). El motiu RGD es mostra en color groc.

El VFA presenta un genoma compost per una sola cadena d'RNA de 8.500 nucleòtids de longitud i amb polaritat positiva. La càpsida, molt similar a la d'altres picornavirus, està composta per 60 còpies de quatre proteïnes estructurals diferents, VP1 a VP4, que s'organitzen formant seixanta protòmers, cadascun dels quals conté una molècula de cada proteïna estructural. Grups de cinc protòmers constitueixen dotze pentàmers, que s'uneixen per formar la càpsida vírica, de simetria icosaèdrica, gairebé esfèrica i amb un radi aproximat de 150 Å (223). La proteïna VP4 no està exposada a l'exterior i es pot considerar una extensió aminoterminal de la VP2. Les

proteïnes VP1, VP2 i VP3 estan parcialment exposades i presenten una estructura molt semblant, en forma de falca, constituïda per un nucli de vuit làmines β antiparal·leles, anomenades alfabèticament segons el seu ordre en la seqüència d'aminoàcids (224). Aquestes làmines estan connectades per llaços de longitud variable que s'identifiquen per les làmines β que uneixen i que es troben implicats en l'antigenicitat del virus.

La superfície de la càpsida és molt uniforme, excepte per la presència de certes protuberàncies. D'entre aquestes destaca el llaç β G- β H de la proteïna VP1 (aminoàcids 140 a 160), així com l'extrem carboxiterminal de la mateixa proteïna. Ambdós han estat descrits com els principals llocs antigènics del virus i han estat anomenats *lloc A* i *C* respectivament, tot i que en el serotip O podrien formar part d'una única regió antigènica (223). En el cas del serotip C també s'ha descrit el lloc antigènic D, epítotop discontinu format per residus de la VP1 (al voltant de l'aminoàcid 193), de la VP2 (entre els aminoàcids 70 i 80) i de la VP3 (residus 58-61) (225).

El lloc antigènic A està format per múltiples epítotops B continus (226;227) i s'ha demostrat que és la regió més variable d'aquest virus (228). Es troba situat en el llaç β G- β H de la proteïna VP1, l'estructura tridimensional del qual no s'ha pogut resoldre a partir de la difracció de raigs X de cristalls del virió (223;225), cosa que indica que aquest segment presenta una flexibilitat elevada i la possibilitat d'adoptar diverses conformacions. Tot i així, l'estructura del llaç s'ha pogut determinar mitjançant la reducció d'un pont disofre característic del serotip O, que connecta aquesta regió amb la proteïna VP2, i, en el cas del serotip C, amb la síntesi química d'un fragment d'aquest llaç anomenat A15 (aminoàcids 136 a 150), acomplexat amb un Fab d'un anticòs neutralitzant (229). En ambdós casos, el llaç presenta una estructura molt similar, amb una hèlix α curta a l'extrem carboxil composta per vuit aminoàcids i amb els extrems interaccionant entre si, de manera que adopta una estructura de caràcter cíclic. Els residus Arg-141, Gly-142 i Asp-143 (aïllat C-S8c1) conformen el motiu RGD, que es troba totalment exposat dins del llaç. Aquest motiu és altament conservat i es troba involucrat en la unió amb integrines cel·lulars (230), (204;226) juntament amb altres aminoàcids propers que probablement modulen la seva conformació. En el cas del serotip C, dues leucines altament conservades en les posicions +1 i +4 respecte al motiu RGD són crítiques per al reconeixement cel·lular (226). Experiments duts a terme amb pèptids sintètics també suggereixen que l'extrem carboxil de la VP1, proper al motiu RGD en l'estructura de la proteïna, pot ser necessari per a la unió del VFA a la cèl·lula hoste (230). Altres estudis suggereixen llocs alternatius d'unió del VFA, ja que mutacions en el motiu RGD no eviten que els virus deixin de ser infectius i que es repliquin *in vitro* (231). S'ha demostrat que el virus inicia la seva infecció amb el reconeixement de les integrines $\alpha_v\beta_3$, $\alpha_v\beta_6$, $\alpha_v\beta_1$ (232;233) i també per altres receptors secundaris,

com l'*heparan sulfat* (234;235) i la integrina $\alpha_5\beta_1$ (203;236), essencialment en virus adaptats a cultius *in vitro*.

El pèptid GH23, utilitzat en aquest treball i en estudis anteriors dins del nostre grup, és un segment de 23 aminoàcids (residus 134 a 156) de la proteïna VP1 del serotip C (clon C-S8c1) que correspon al lloc A i que conté el motiu d'unió a integrines cel·lulars RGD.

I.A.6.SISTEMA DE PRODUCCIÓ DE LES PROTEÏNES RECOMBINANTS

La producció de proteïnes recombinants per a la seva posterior purificació es pot portar a terme en diferents tipus cel·lulars: llevats com els del gènere *Saccharomyces*, fongs filamentosos com els dels gèneres *Neurospora* o *Aspergillus*, cèl·lules de mamífer o d'insecte i també en cèl·lules procariotes grampositives, com les dels gèneres *Bacillus* o *Streptomyces*, o gramnegatives, com les d'*Escherichia coli*. Cadascun d'aquests organismes presenta avantatges i inconvenients, però *E. coli* ha estat i, continua essent-ho actualment, l'organisme més freqüentment utilitzat en el laboratori per a l'expressió de gens heteròlegs (237). En gran part, això és deu al gran coneixement que es té d'aquest microorganisme, a la seva fàcil i econòmica manipulació, a l'ampli ventall de soques mutades amb diferents fenotips que existeixen i a la gran varietat de sistemes i vectors d'expressió que s'han desenvolupat per a la seva utilització. Tot i així, la producció de proteïnes recombinants sovint presenta problemes associats quan s'intenten obtenir quantitats proteiques suficients i biològicament actives. Es pot observar toxicitat envers a la cèl·lula productora, incapacitat de les cèl·lules *E. coli* de realitzar modificacions postraduccionals en el cas de productes d'origen eucariota, pèrdua del plasmidi codificant, acumulació en forma insoluble (cossos d'inclusió) del producte sintetitzat o bé degradació d'aquest per part de la maquinària proteolítica cel·lular.

En el nostre grup vem portar a terme un estudi en el qual s'observava que la producció de proteïnes recombinants en el sistema d'expressió basat en els promotors p_R-p_L del bacteriòfag lambda i el seu repressor termosensible, induïa l'expressió de gens del sistema SOS independentment de la naturalesa del gen, a través de l'aturada de la síntesi de DNA cel·lular (Arís *et al.* 1998, vegeu annex) i en un procés dependent de LexA (238). L'activació del sistema SOS podria explicar fets com ara l'increment de la taxa de mutació recA-dependent durant l'expressió de gens recombinants (239), la filamentació i altres símptomes observats en cèl·lules que estan expressant activament gens recombinants. Aquest efecte no va ser detectat en altres sistemes d'expressió i sembla que té un origen multifactorial. L'activació del sistema SOS no és exclusivament dependent de les característiques del sistema d'expressió termoinduïble (xoc tèrmic, presència dels promotors p_R-p_L o del repressor CI857) i sembla que requereix la síntesi activa del producte recombinant. Tot i que fan falta estudis més detallats per establir les bases moleculars d'aquesta inducció

del sistema SOS, aquest fet ha estat reconegut per altres autors (240)(241). Sembla que la degradació proteolítica de la proteïna expressada podria ser un modulador important d'aquesta resposta observada, encara que no sigui l'únic agent inductor.

Els promotors lítics del bacteriòfag lambda són uns dels més forts que hi ha entre els utilitzats per a l'expressió de proteïnes recombinants en *E. coli* (p_{lacUV5} , p_{lac} , $T7p_{A1}$ i p_{A2} ...), i això es tradueix en una elevada taxa de síntesi proteica de la qual en podria resultar una proteòlisi massiva del producte. Segurament, per tal d'estimular aquest atac proteolític cal que hi hagi una quantitat crítica de polipèptids naixents mal plegats (242), a la qual pot ser que no s'arribi amb els altres promotors utilitzats en aquest treball, induïbles per IPTG. A més a més, el procés de degradació podria estar potenciat per l'elevada temperatura d'inducció (243). Està descrit que la proteòlisi elevada provoca efectes deleteris a les cèl·lules i implica una inhibició del creixement cel·lular (244;245). A part de la proteasa La, n'hi ha d'altres ATP-dependents que es troben implicades en la degradació activa de proteïnes recombinants (246). El consum massiu d'ATP com a conseqüència de la sobreproducció pot promoure un descens dels nivells d'ATP intracel·lulars que afectaria algunes funcions cel·lulars com ara la replicació del DNA. D'altra banda, en una situació d'estrès com pot ser la sobreproducció de proteïnes recombinants, la quantitat de xaperones podria ser insuficient per al plegament de totes les proteïnes que s'estan produint i per a altres funcions vitals per a la cèl·lula, ja que algunes d'aquestes xaperones, com la DnaK, són necessàries per a la replicació de DNA (247).

DESENVOLUPAMENT
DE PROTEÏNES QUIMÈRIQUES MULTIFUNCIONALS
COM A VECTORS DE TRANSFERÈNCIA GÈNICA
MEDIADA PER RECEPTOR

II.OBJECTIUS

L'objectiu general d'aquest treball ha estat el desenvolupament de proteïnes quimèriques recombinants útils per a la transferència gènica no vírica, i l'estudi de les bases moleculars que regeixen la combinació funcional de dominis heteròlegs en aquest tipus de vectors. Els objectius concrets que han marcat les nostres pautes de treball han estat els següents:

1. Explorar l'ús d'enzims β -galactosidasa presentadors de pèptids vírics com a sistema de transferència intracel·lular.
2. Desenvolupar proteïnes quimèriques multifuncionals, portadores de dominis d'unió a àcids nucleics i de reconeixement cel·lular, per mediar la transferència dirigida de DNA.
3. Estudiar l'organització molecular dels complexos DNA-proteïna per optimitzar el procés de transferència gènica.
4. Avaluar el potencial *in vivo* dels vectors desenvolupats.
5. Millorar les proteïnes quimèriques recombinants mitjançant la incorporació de nous dominis funcionals.

DESENVOLUPAMENT
DE PROTEÏNES QUIMÈRIQUES MULTIFUNCIONALS
COM A VECTORS DE TRANSFERÈNCIA GÈNICA
MEDIADA PER RECEPTOR

III.RESULTATS

TREBALL I

A CELL ADHESION PEPTIDE FROM FOOT-AND-MOUTH DISEASE VIRUS CAN DIRECT CELL TARGETED DELIVERY OF A FUNCTIONAL ENZYME

Antonio Villaverde, Jordi X. Feliu, Anna Arís, Richard P. Harbottle, Antoni Benito,
Charles Coutelle

Biotechnology and Bioengineering, Vol. 59, No. 3, August 5, 1998

Aquest article va ser el punt de partida del present treball de recerca i malgrat que els resultats que s'hi discuteixen no componen la base principal d'aquesta tesi doctoral, vam creure adequat incloure'ls en aquest apartat perquè són l'inici de la línia d'investigació d'aquest projecte. En definitiva, vam avaluar el potencial de pèptids vírics que comprenien motius de reconeixement d'integrines, basats en RGD, per dirigir la unió i internalització cel·lular d'enzims que s'hi troben units. Els resultats confirmen que β -galactosidases quimèriques, portadores d'aquests pèptids, són capaces d'unir-se a cèl·lules de mamífer i internalitzar-s'hi, mantenint transitòriament la seva activitat enzimàtica a l'espai intracel·lular. Aquests resultats promouen l'exploració del potencial de proteïnes presentadores de pèptids vírics en la transferència dirigida d'enzims o d'àcids nucleics com una alternativa a l'ús de vectors vírics.

A Cell Adhesion Peptide from Foot-and-Mouth Disease Virus Can Direct Cell Targeted Delivery of a Functional Enzyme

Antonio Villaverde,¹ Jordi X. Feliu,¹ Anna Aris,¹ Richard P. Harbottle,² Antoni Benito,^{1*} Charles Coutelle²

¹*Institut de Biologia Fonamental and Departament de Genètica i Microbiologia, Universitat Autònoma de Barcelona, Bellaterra, 08193 Barcelona, Spain; telephone: 34 3 5812148; fax: 34 3 5812011; e-mail: a.villaverde@cc.uab.es*

²*Division of Biochemical Sciences, Molecular Genetics, Imperial College, School of Medicine at St. Mary's Hospital, Norfolk Place, London, W2 1PG, United Kingdom*

Received 24 July 1997; accepted 26 November 1997

Abstract: The G-H loop of foot-and-mouth disease virus is a disordered protrusion of the VP1 protein exposed on the virion surface. This short stretch includes an arginine-glycine-aspartic acid tripeptide, a recognized integrin-binding motif, which is responsible for cell attachment and infection. Eight copies of a peptide reproducing the amino acid sequence of this FMDV ligand have been displayed in solvent-exposed regions on an enzymatically active recombinant β -galactosidase. This viral peptide segment enables the chimeric enzyme to bind mammalian cell lines with different efficiencies, probably depending on the number of suitable cell receptors present on each of them. Moreover, it also promotes the internalization of the attached enzyme, which is transiently active inside the cells. These results suggest further exploration of the potential use of short adhesion peptides of viral origin as cell attachment tags to direct the targeted delivery of both genes and enzymes, instead of whole, infectious viruses. © 1998 John Wiley & Sons, Inc. *Biotechnol Bioeng* 59: 294–301, 1998.

Keywords: RGD; FMDV; internalization; integrins; cell binding; β -galactosidase

INTRODUCTION

Viruses have been predominantly used as biological tools for gene transfer into susceptible cells. The transducing ability of bacteriophages such as λ , P22 or P1 has been extensively exploited for many years for the directed exchange of genetic material in bacteria. Likewise, animal viruses such

as retroviruses (McLachlin et al., 1990), adenoviruses (Rosenfeld et al., 1992) and adeno-associated viruses (Kotin, 1994) are engineered to generate new vectors suitable for gene transfer in mammals. The cell recognition specificity of viruses and their ability to transfer genetic material into the target cells make viral vectors very attractive for delivery and expression of recombinant genes. However, in spite of the great promise for gene therapy by this approach, the potential risks associated with retroviral integration into the host genome and adverse host reactions against adeno-virus application (Yang et al., 1995) demonstrate some of the present limitations of virus-mediated gene delivery. It would therefore, be desirable to use the virus-derived cell targeting properties to mediate DNA or protein delivery while excluding random DNA integration and reducing vector immunogenicity.

In this work, we have explored the ability of a short peptide containing the cell attachment motif of foot-and-mouth disease virus (FMDV), to direct the cell targeting and delivery of a recombinant, enzymatically active β -galactosidase into cultured mammalian cells. About 30 amino acids of the FMDV VP1 protein form the G-H loop, a disordered protrusion exposed to the solvent (Lea et al., 1994). This exposed segment contains the cell adhesion tripeptide arginine-glycine-aspartic acid (RGD), a well-known integrin-binding ligand (Ruoslathi and Pierschbacher, 1987), 60 copies of which are symmetrically displayed at the capsid surface around the five-fold axis. In FMDV, the RGD peptide has been proposed to be the unique cell attachment site on the virus surface because its absence abolishes infectivity (McKenna et al., 1995). Because RGD-containing peptides also promote internalization of different natural and recombinant viruses (Hart et al., 1994; Wickham et al., 1993), this stretch might serve for both cell recognition and FMDV entry through the formation of receptosomes. Although little is known about the

* *Present address:* Laboratoire d'Immunochimie des Peptides et des Virus, Institut de Biologie Moléculaire et Cellulaire, CNRS, 15 rue René Descartes, 67084 Strasbourg Cedex, France.

Correspondence to: Antonio Villaverde

Contract grant sponsors: CICYT; Fundació Maria Francesca de Roviralta; CIRIT; Medical Research Council; Muller Bequest; March of Dimes; the British Council

Contract grant numbers: BI095-0801; 1995SGR 00376

nature of the cell receptor, experimental data strongly support the hypothesis that the vitronectin receptor (integrin $\alpha_v\beta_3$) could be the main virus receptor in susceptible cells (Berinstein et al., 1995; Jackson et al., 1997; Villaverde et al., 1996) and the fibronectin receptor (integrin $\alpha_5\beta_1$) a possible secondary site for cell attachment (Chambers et al., 1996; Villaverde et al., 1996). On the other hand, heparan sulfate receptors can also allow cell-binding of culture-adapted FMDV variants (Jackson et al., 1996; Sa-Carvalho et al., 1997), and the isolation of FMDV mutants carrying amino acid substitutions in the RGD motif and efficiently multiplying in cell culture (Martínez et al. 1997) also suggests some flexibility in the nature of the involved receptors, especially when the viral population is submitted to strong selective pressures.

We show here that the presentation of several copies of a FMDV RGD-containing ligand on the surface of recombinant *Escherichia coli* β -galactosidase promotes both binding and internalization of the chimeric enzyme into cultured cell lines with different specificity, and that the enzyme is transiently active inside the target cells. We therefore conclude that a viral, RGD-containing motif is sufficient to direct cell recognition and also internalization of a fused, high molecular mass protein. The cell targeting properties of short recombinant peptides, suggest the exploration of novel strategies based on viral cell binding motifs joined to appropriate molecular complexes, instead of whole virus particles, for both protein and gene therapy.

MATERIAL AND METHODS

Plasmids and Bacterial Strains

Plasmids pAB1 and pM275VP1 direct the CI857-controlled synthesis of chimeric *E. coli* β -galactosidases carrying FMDV peptides at the amino terminus and within the activating interface (positions 272 to 287) (Jacobson et al., 1994) of the enzyme, respectively. These viral peptides reproduce segments of VP1 protein from the FMDV isolate C-Sta. Pau, Spain/70, clone C-S8c1 (Sobrinho et al., 1983), containing the RGD motif and the flanking sequences. Features of these constructs have been described elsewhere (Benito and Villaverde, 1994; Benito et al., 1995). Plasmid pAB1275VP1 encodes a hybrid between these proteins which carries two viral peptides in each monomer, at the N terminus and the activating loop of β -galactosidase, respectively. It has been constructed by replacing the *NcoI*-*AocI* fragment of pM275VP1 by its equivalent from pAB1. More details about pAB1275VP1 construction are given elsewhere (Benito et al., 1996). All of the resulting proteins are enzymatically active. Production of AB1 protein has been accomplished in strain M72 (Vidal et al., 1991), while M275VP1 and AB1275VP1 have been obtained in BL26 Lon (Studier and Moffat, 1986). Plasmid pLACZ (Benito et al., 1993) in BL26 has been employed to produce a non

fused recombinant β -galactosidase (protein LACZ) to be used as a control.

Production and Purification of Recombinant Proteins

Recombinant proteins were produced in a Biostat B bioreactor (B. Braun, Germany) with a working volume of 2 L. Bacterial cells were inoculated from an overnight culture of 25 mL, grown at 28°C in LB medium plus 100 μ g/mL ampicillin. To induce the synthesis of the fusion proteins the temperature was shifted to 42°C when the OD₅₅₀ reached about 0.4. Airflow was constant at 6 L min⁻¹, pH was kept at 7.2 with 0.5M HCl and 4M NaOH and pO₂ was fixed at 50% of the saturation value by a stirring control loop. Some production experiments were also done in 1 L shaker flasks. After 6 h of induction, cells were harvested by centrifugation at 2000g for 10 min at 4°C. The resulting pellet was resuspended in 15 mL of purification buffer (Ullmann, 1984), supplemented with 25 μ M benzamidine and 1 mM phenylmethylsulfonyl fluoride as protease inhibitors, and sonicated as described (Feliu and Villaverde, 1994) in a cell disruptor Braun Labsonic U. After centrifugation, supernatants were applied three times to a 20 mL TPEG-Sepharose column equilibrated with the purification buffer (0.02M Tris, 0.01M MgCl₂, 1.6M NaCl, pH 7.5) and eluted after washing with 0.1M sodium borate plus 0.01M β -mercaptoethanol at pH 10, according to a previously described protocol (Ullmann, 1984). Samples were dialyzed against TM buffer (0.02M Tris, 0.01M MgCl₂, pH 7.5). Purified proteins were checked by PAGE followed by both immunoblotting (Benito et al., 1995) and Coomassie blue staining, quantified by indirect ELISA with polyclonal serum anti- β -galactosidase and stored at -80°C until required.

Cell Binding Assay

Previously described procedures (Brasaemle and Attie, 1988; Hart et al., 1994) were modified to analyze cell binding to β -galactosidase fusion proteins. Usually, 2.5 pmols of protein in PBS were bound to ELISA COSTAR® EIA/RIA plates overnight at 4°C. Wells were washed in PBS and blocked with 3% BSA in PBS for 1 h at 37°C. Trypsinized cells from 80% confluent cultures were added to about 7 \times 10⁵ cells/mL (50 μ L per well), incubated at 37°C for 90 min, gently washed in PBS and the remaining cells fixed with methanol. After staining with crystal violet and further washing with PBS, cells were lysed with 1% SDS and the absorbance at 570 nm (A₅₇₀) measured in a microtiter reader. All assays were done at least in triplicate. Blanks were obtained by cell binding to BSA. Cell lines used were HeLa (human cervix carcinoma, ECACC 85060701), COS7 (SV40-transformed monkey kidney, ECACC 87021302), CaCo (human colon adenocarcinoma, ECACC 86010202), 3T3 (mouse embryo fibroblast, ECACC 88031146), Saos2 (human osteogenic sarcoma, ATCC HTB 85) and C33A (human cervix carcinoma, ATCC HTB 31), all of them obtained from ordinary cell collections.

Immunofluorescent Microscopy

The target cells were cultured on appropriate slides in DMEM supplemented with 10% fetal calf serum up to 80% confluence. After replacing the culture medium, about 20 $\mu\text{g}/\text{mL}$ of recombinant AB1275VP1 protein in 100 μL of fresh medium were added to different wells and kept at 37°C for about 3 h. At different times, slides were processed as described (Hart et al., 1994). A commercial mouse mAb directed against β -galactosidase (from Boehringer Mannheim) and the 3E5 mAb directed against a B-cell epitope within the G-H loop of FMDV (Capucci et al., 1984; Mateu et al., 1990; Benito et al., 1995) were used to immunodetect the proteins. Cells were incubated with anti-mouse Ig antibody conjugated to rhodamine (from Dako). Control samples were incubated only with rhodamine-conjugated antibody. After sealing the slides, samples were examined in a Leica TCS 4D confocal laser scanning microscope with an argon-krypton laser source.

Determination of β -Galactosidase Activity

Cells were cultured in 96-well tissue culture grade plates (Corning), in DMEM supplemented with 20% fetal calf serum for up to 3 days, until they reached 80% confluence. Wells were then washed once with fresh medium and 50 μL of protein samples containing 20 pmol of AB1275VP1 or LACZ were added per well. At different times, wells were processed in duplicates for determination of β -galactosidase activity by gently washing twice with PBS to remove the non-bound enzyme. For analysis of the total activity retained by the cells, 50 μL of lysis buffer (0.1% Triton X-100, 250 mM Tris, pH 8.0) were added. After 5 min incubation, 150 μL of 4 mg/mL ONPG in Z buffer [0.06M Na_2HPO_4 , 0.04M NaH_2PO_4 , 0.01M KCl, 0.001M MgSO_4 , 0.04M β -mercaptoethanol, pH 7.0 (Miller, 1972)] were added and the mixture incubated for 30 min. The reaction was stopped with 50 μL of 1M Na_2CO_3 . The absorbance was determined at 405 nm in an ELISA microtiter reader. Extracellular activity of the bound enzyme was determined by adding PBS instead of the lysis buffer and proceeding further as above. No cell lysis was observed under these conditions during the assay. Intracellular activity was obtained as the difference between total and extracellular activities at each incubation time. Because the enzymatic activity of β -galactosidase fusion proteins usually decreases in the presence of detergents, β -galactosidase activity of pure proteins was also determined in the presence of the lysis buffer. Correction factors (usually between 1.9 and 2.2) were applied to the samples treated with Triton X-100. To monitor the internalization of bound AB1275VP1, wells were washed 60 min after adding the protein and treated as described above. In this case, 100 μL of the ONPG solution were used and the reaction time was 60 min.

Alternatively, cell incubation with AB1275VP1 was performed in parallel at 4 and 37°C to discriminate between cell binding and internalization. At different times, cells

were cooled to 4°C and non-attached recombinant protein removed by repeated, gentle washing with fresh medium at 4°C. Bound, external protein was then inactivated by mild proteolysis for 45 min at 4°C, with 5 g/L trypsin and in presence of 1 mM EDTA. After further centrifugation, cell pellets were washed with fresh medium to inactivate the protease, resuspended in PBS and the cells lysed with lysis buffer, and the total β -galactosidase activity was measured as described above. Because some time-dependent inactivation of AB1275VP1 was observed at 37°C, aliquots of this protein in cell-free culture medium were incubated at this temperature and at 4°C, and the enzymatic activities analyzed at different times. The relative inactivation varied between 46.8% after 30 min and 92.7% after 150 min, and the standard deviation of the analyzed enzymatic activities was always lower than 10% of the average value. This differential inactivation was taken into account for the analysis of data.

RESULTS

Biological Properties of β -Galactosidase Proteins Containing FMDV Cell Adhesion Tags

Several genetically engineered β -galactosidase proteins have been used throughout this study. AB1 and M275VP1 proteins contain four copies of the FMDV RGD motif, one per monomer. The insertion sites (at the N terminus and the activating loop of β -galactosidase respectively) are solvent-exposed (Jacobson et al., 1994) and tolerant to insertions of large foreign peptides (Benito and Villaverde, 1994; Ullmann, 1992). Doubling of these adhesion tags on the surface of β -galactosidase was easily achieved by constructing a hybrid between AB1 and M275VP1 proteins (Fig. 1A). In the resulting construct, AB1275VP1, eight copies of the viral peptide are presented in all spatial orientations (Fig. 1B). The new hybrid protein, as well as AB1 and M275VP1, is produced in *E. coli* at high yields from a p_L - p_R -based system, it is proteolytically stable and enzymatically active. The specific activities of AB1, M275VP1, and AB1275VP1 calculated in duplicate after purification, were 694 ± 22.3 , 518 ± 49.6 , and 272 ± 69.2 units/ μg respectively, whereas that of the parental LACZ protein (a recombinant non-chimeric β -galactosidase) was 1150 ± 157.6 units/ μg . Some loss of enzymatic activity during storage at -80°C was observed, particularly in AB1.

Binding of FMDV- β -Galactosidase Fusion Proteins to Different Cell Types

We have previously shown that the recombinant RGD-containing viral ligand, exposed at the β -galactosidase surface, is able to bind efficiently to both BHK and HeLa cells through vitronectin receptors and to a lesser extent, through fibronectin receptors (Villaverde et al., 1996). The cell attachment properties of protein AB1275VP1 are shown in Figure 2A. A distinctive selectivity of the recombinant

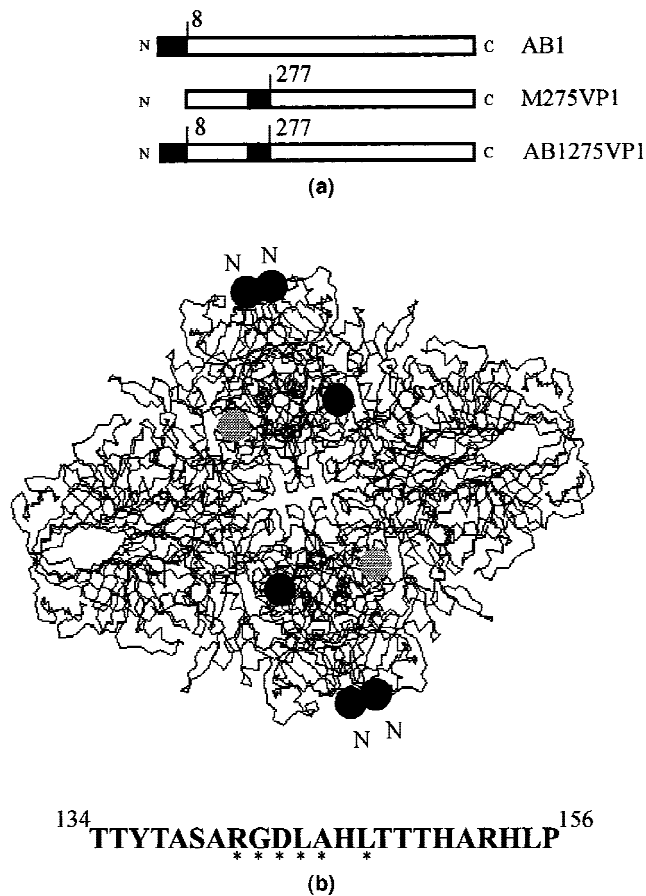


Figure 1. (A) Location of FMDV segments (in black bars) in AB1, M275VP1 and AB1275VP1 β -galactosidase chimeric monomers. The bacterial protein is shown as a white bar. Numbers indicate the β -galactosidase residues flanking the viral segment, and letters the amino (N) and carboxy (C) termini. More details about these proteins are given elsewhere (Benito et al., 1995). (B) Schematic representation of the AB1275VP1 protein construct based on the three-dimensional structure of β -galactosidase. Each monomer contains two FMDV cell adhesion tags (shown as spheres) exposed to the solvent. Grey spheres indicate tags displayed at the rear side of the molecule. The amino terminal fusion sites are also indicated (N). The amino acid sequence of the FMDV RGD-containing peptide inserted at the activating interface of β -galactosidase (between residues 275 and 276), is depicted at the bottom. Numbers indicate the amino acid residues of FMDV VP1. The residues labeled with asterisks are those critical for cell binding of the specific FMDV isolate used in this work (Mateu et al., 1996). The peptide inserted at the amino termini also includes this segment and spans positions 129 to 185 of VP1. The figure was produced from the atomic coordinates of *E. coli* β -galactosidase (Jacobson et al., 1994) using the RasMol program v. 2.6.

FMDV cell adhesion tag to bind to different human (HeLa, C33A, Caco-2, Saos-2, C-33 A) and non-human (3T3, COS7) mammalian cell lines was observed. Among the cells tested, HeLa cells are recognized best by the viral motif, with a non-specific binding of LACZ protein of only 10% of that shown by AB1275VP1 (Fig. 2A). In agreement with previous results (Villaverde et al., 1996), the viral peptide inserted in the activating loop of β -galactosidase (in M275VP1) reproduces the cell attachment properties of the FMDV G-H loop much better than the fusion at the N-terminal end in AB1 (Fig. 2B). A similar observation has

also been made with regard to antigenicity (Benito et al., 1995).

FMDV-Directed Internalization of Recombinant β -Galactosidase into Cultured Cells

Internalization of the AB1275VP1 protein was studied in HeLa cells by confocal immunofluorescent microscopy. One hour after adding soluble AB1275VP1 to the culture medium, the chimeric protein was immunodetected in permeabilized cells by a mAb directed against VP1 protein (Figs. 3A, B). Similar results were obtained with a mAb directed against β -galactosidase (not shown). By examining serial confocal images, an important fraction of the immunodetected protein was visible inside the cell in a clustered pattern, whereas only a part was associated with the cell membrane (Fig. 3C). These results show that the FMDV RGD motif is not only able to promote cell adhesion but also internalization of the whole fusion protein.

Enzymatic Activity of Internalized Chimeric Proteins

To further explore the status of the internalized β -galactosidase proteins, we analyzed the enzymatic activity in cell cultures after exposure to the recombinant proteins AB1275VP1 and LACZ, respectively. The total cell-associated activity of AB1275VP1 increases during the first 30 min of incubation, after which a slight decrease is observed (Fig. 4A). Low but significant values of intracellular activity of AB1275VP1 were detected already after 15 min, reaching about 50% of the total activity after 30 min and plateauing up to 120 min. The subsequent decrease in the intracellular activity could be due to enzyme inactivation combined with a less efficient uptake of the bound protein at longer times. Molar amounts of active enzyme calculated

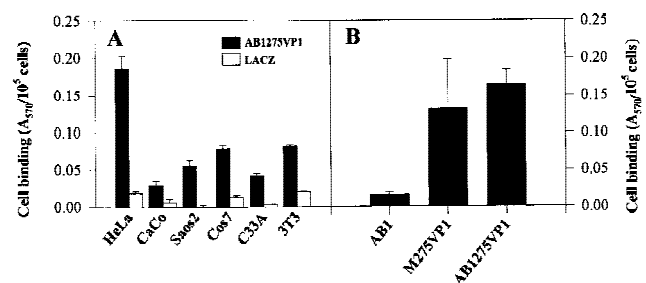


Figure 2. FMDV peptide-mediated cell binding to chimeric β -galactosidase (A) Binding of different cell lines to AB1275VP1 and LACZ proteins at 90 min after incubation. A two-factor ANOVA test shows significant differences between the cell binding of AB1275VP1 and that of the control LACZ protein, and also in the binding of the recombinant RGD-carrying proteins to different cell lines ($p < 0.01$ for both analysis). (B) HeLa cell binding promoted by AB1, M275VP1, and AB1275VP1. A two-factor ANOVA test indicates significant differences between the cell binding of different proteins ($p < 0.01$), and a further Newman-Keuls test reveals significant differences between the cell binding of AB1 and either M275VP1 and AB1275VP1 ($p < 0.01$), but not between M275VP1 and AB1275VP1.

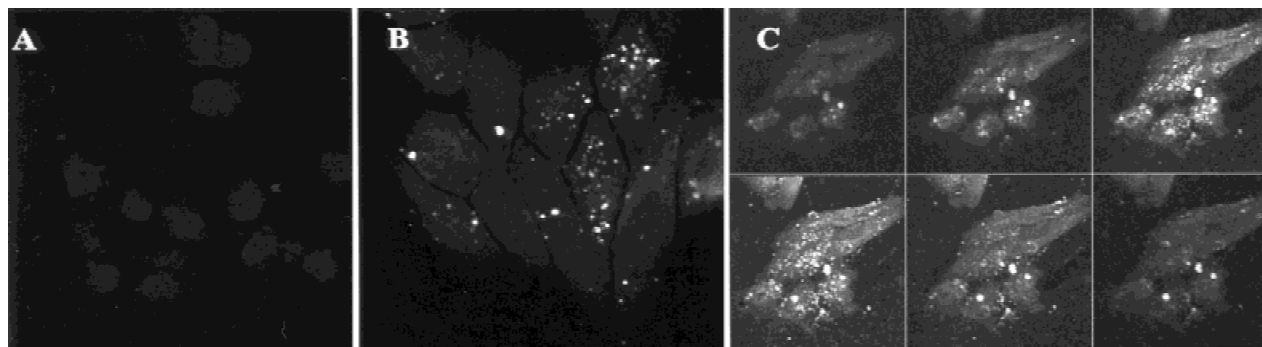


Figure 3. Immunodetection of internalized recombinant protein. Protein AB1275VP1 was immunodetected in HeLa cells using mAb 3E5 anti-VP1, at 90 min after its addition to the cultures (panel B). A control without 3E5 antibody is shown in panel A. In panel C, a series of confocal sections of labeled cells (from top left to bottom right) reveals the vesicular location of the recombinant protein in the cell cytoplasm. 3E5 from ascitic fluid was used at a dilution 1:4000. The titer of this mAb in an ELISA was 1:16,000.

from the specific activity of the protein sample are also indicated. In the control experiment with protein LACZ, lacking the viral motif, (panel B), the level of bound active protein remains nearly constant from 15 min incubation onwards throughout the experiment. Its molar amount is about 30 times lower than that found for AB1275VP1. No intracellular activity of protein LACZ was detected under our assay conditions, showing that the uptake of AB1275VP1 is dependent on the viral peptide as previously shown for M275VP1 (Villaverde et al., 1996). Cell detachment or changes in cell morphology have not been observed during these experiments.

To exclude the possibility that the apparent intracellular activity was due to reactivation of externally bound protein after membrane solubilization rather than a genuine internalization, we performed a second time-course experiment with parallel incubation at 4 and 37°C. Integrin binding occurs normally at 4°C but integrin-mediated internalization is efficiently inhibited at this temperature (Wickham et al., 1993). After a mild trypsin treatment, the external, membrane-associated enzymatic activity is reduced to background levels (Fig. 5A). This allows the measurement of internal enzyme activity by comparison of total activities of cells incubated at 4°C (no internalization) with those incubated at 37°C (internalization) (Fig. 5B). Although the kinetics of the internal activity differs slightly from that of the experiment shown in Figure 4, it clearly proves that the majority of the β -galactosidase retained by the cells is not membrane-associated but indeed internalized.

To investigate the kinetics of both the bound and the internalized enzyme activities on the same cells, the first method of analysis was used and the bound activity determined by subtraction of the internal from the total activity. Figure 6 shows that after exposure of cells to the chimeric AB1275VP1 protein for 1 h, followed by washing the unbound protein off and further incubation at 37°C, the amount of the bound external active protein decreases concomitant with an increase of its intracellular activity. The following decrease can be interpreted as the result of enzyme inactivation. The similarity in the early uptake of

bound protein and the kinetics of internalized activity presented in Figure 5 would suggest that the higher value of internal activity at 30 min, shown in Figure 4A, may not be representative. Although the time-dependence of the kinetics shown in Figure 6 is not significant ($p > 0.1$ in a two-factor ANOVA test), these results, together with those shown in Figures 4 and 5, suggest that the half-life of the internalized active AB275VP1 could be between 1 and 2 h.

DISCUSSION

A few copies of the FMDV cell-binding domain (Leippert et al., 1997; Mateu et al., 1996), added to the *E. coli* β -galactosidase by recombinant DNA procedures, enables the

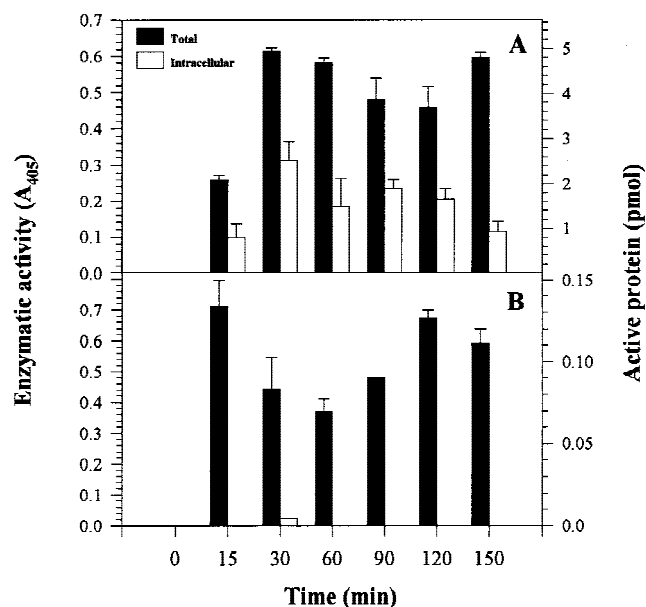


Figure 4. Kinetics of total and intracellular β -galactosidase activities in HeLa cells after incubation with AB1275VP1 (A) or LACZ proteins (B). The time-dependence of the intracellular activity of AB1275VP1 was assessed by a two-factor ANOVA test ($p < 0.01$). Molar amounts of the recombinant proteins were estimated from their specific activity.

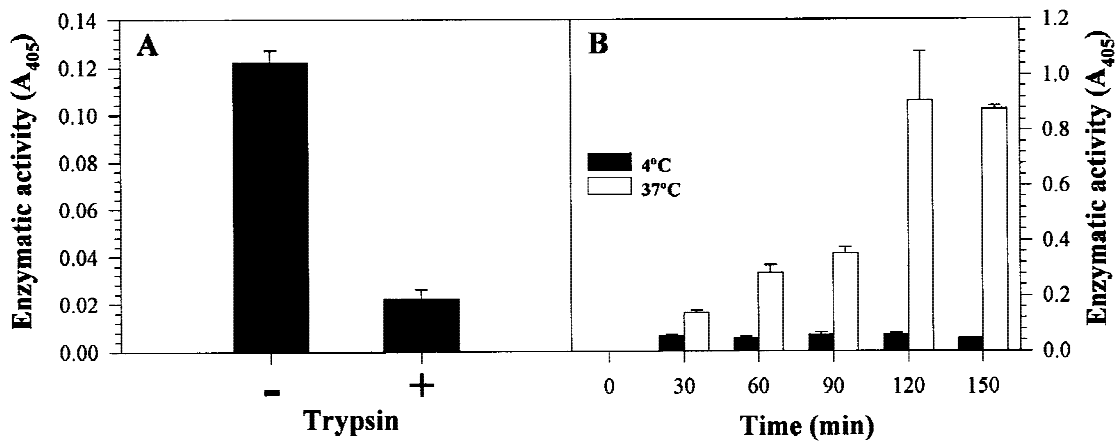


Figure 5. (A) Trypsin-mediated inactivation of externally bound AB1275VP1 chimeric protein at 4°C. (B) Time-dependence of β -galactosidase activity retained by HeLa cells during exposure to AB1275VP1 protein at 4° and 37°C. Enzymatic activity was measured after trypsin inactivation and cell lysis. A two-factor ANOVA test reveals a significant, time-dependent difference between the activity retained by cells at 4 and 37°C ($p < 0.01$).

bacterial enzyme to bind and internalize in cultured mammalian cells with a significant degree of specificity. On the virion surface, the G-H loop of protein VP1, which includes the RGD cell ligand, is not visible by crystallographic analysis (Acharya et al., 1989; Lea et al., 1994), indicating a high flexibility of this protein segment. Although structural data of the FMDV peptide inserted into the chimeric β -galactosidase is not available, a high reactivity of protein M275VP1 with a set of anti-FMDV mAbs has been previously observed, in some cases even higher than that obtained with synthetic peptides and similar to that of native FMDV particles (Benito et al. 1995). Because the binding of antibodies to this antigenic peptide seems to be strongly dependent on conformation (Harrison, 1989), the structure or the conformational spectrum adopted by the viral peptide as inserted at the position 275 of β -galactosidase could be compatible with that actually displayed on the native virus particles. Moreover, the RGD-dependent cell attachment properties of M275VP1 (Villaverde et al., 1996) are in agreement with a possible biologically competent structure of the recombinant peptide.

After internalization, the FMDV- β -galactosidase chimera is transiently active. The time courses presented in Figures 4, 5, and 6 suggest that, under our assay conditions, the majority of the soluble protein retained by the cells is internalized in less than 2 h, and that the half-life of the functional enzyme in the endosomal compartments is probably longer than 1 h. The moderate loss of enzymatic activity can be explained by destruction of the tetrameric functional structure even before its presumed proteolysis. Although a more detailed investigation would be required to follow the fate of the chimera inside the target cells, its persistence in the cell is long enough to allow further studies on the use of this cell targeting principle for the design of delivery vehicles. In particular, appropriate strategies for escape from the endosomal compartments may provide a further improvement of the stability and activity of the internalized proteins.

Several cell-binding ligands have been employed to modify the cell targeting properties of infectious recombinant viruses (Chambers et al., 1996; Nolan, 1997). Similarly, synthetic RGD-containing peptides have been used for the cell targeted delivery of attached enzymes (Bekkers et al., 1996). The results presented in this work show that short, RGD-containing cell-adhesion tags of viral origin, displayed at the surface of a recombinant protein, can be efficient tools for cell targeting of the whole chimera, with the construct remaining functional when attached to the cell surface as well as after its internalization. The identification of either internal or terminal permissive sites on proteins for positioning viral peptides will allow the construction of functional, chimeric proteins with cell adhesion properties by simple recombinant DNA procedures. This strategy may be of relevance with regard to specific cell surface labeling, toxin delivery, and protein replacement therapy. Moreover, the fusion of viral cell adhesion peptides to DNA-binding proteins could also provide appropriate vehicles for targeted gene therapy.

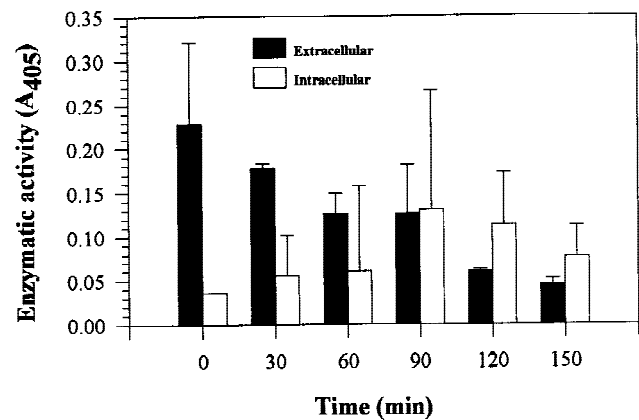


Figure 6. Internalization of bound AB1275VP1 protein. Time dependent evolution of extracellular and intracellular β -galactosidase activity of the AB1275VP1 protein retained by HeLa cells after 1 h of exposure.

The cell targeting properties of RGD-directed binding and internalization of β -galactosidase are probably only influenced by the expression of suitable integrins on the target cell, as previously noticed for adenovirus vectors (Goldman and Wilson, 1995). This allows FMDV-mediated delivery of a chimeric β -galactosidase in cells such as HeLa, which are not natural targets for the virus but display the required receptors. However, because RGD-recognizing cell ligands are rather ubiquitous, the specificity of an engineered recombinant protein could be modulated by further amino acid replacement within this motif or in the surrounding sequences (Wickham et al., 1995; Wickham et al., 1997), or by searching for alternative tags among viral cell ligands, that exhibit a more restricted spectrum in their interaction with cell surface receptors.

We are indebted to B. W. Matthews for helpful data about β -galactosidase structure, to A. Ullmann for training in purification procedures, and E. Brocchi and S. de la Luna for kindly supplying 3E5 mAb and several cell lines, respectively. We also thank F. García, M. Martí, and B. Oliva for technical assistance, and A. Knight and X. Carbonell for helpful comments. J.X.F. and A.B. are predoctoral fellowship holders from V.A.B. and M.E.C., respectively.

References

- Acharya, R., Fry, E., Stuart, D., Fox, G., Rowlands, D., Brown, F. 1989. The three dimensional structure of foot-and-mouth disease virus at 2.9 Å resolution. *Nature* **337**: 709–716.
- Bekkers, A. C., Slothoom, A. J., van Willigen, G., Akkerman, J. W., Verheij, H. M. 1996. Targeting of porcine pancreatic phospholipase A2 to human platelets. Introduction of an RGD sequence and acyl-group by chemical modification. *Eur. J. Biochem.* **238**: 70–76.
- Benito, A., Vidal, M., Villaverde, A. 1993. Enhanced production of p_L -controlled recombinant proteins and plasmid stability in *Escherichia coli* RecA⁺ strains. *J. Biotechnol.* **29**: 299–306.
- Benito, A., Villaverde, A. 1994. Insertion of a 27 amino acid viral peptide in different zones of *E. coli* β -galactosidase: Effects on enzyme activity. *FEMS Microbiol. Lett.* **123**: 107–112.
- Benito, A., Mateu, M. G., Villaverde, A. 1995. Improved mimicry of a foot-and-mouth disease virus antigenic site by a viral peptide displayed on β -galactosidase surface. *Bio/Technology* **13**: 801–804.
- Benito, A., Feliu, J. X., Villaverde, A. 1996. β -Galactosidase enzymatic activity as a molecular probe to detect specific antibodies. *J. Biol. Chem.* **271**: 21251–21256.
- Berinstein, A., Roivainen, N., Hovi, T., Mason, P. W., Baxt, B. 1995. Antibodies to the vitronectin receptor (integrin $\alpha_v\beta_3$) inhibit binding and infection of foot-and-mouth disease virus to cultured cells. *J. Virol.* **69**: 2664–2666.
- Brasaemle, D. L., Attie, A. D. 1988. Microelisa reader quantitation of fixed, stained, solubilized cells in microtiter dishes. *BioTechniques* **6**: 418–419.
- Capucci, L., Brocchi, E., De Simone, F., Panina, G. F. 1984. Characterization of monoclonal antibodies produced against foot-and-mouth disease viruses pp. 32–39. In: Brescia (ed.), Report of a session of the research group of the standing technical committee of the European Commission for the Control of Foot-and-Mouth Disease. Food and Agriculture Organization of the United Nations.
- Chambers, M., Dougan, G., Newman, J., Brown, F., Crowther, J., Mould, A. P., Humphries, M. J., Francis, M. J., Clarke, B., Brown, A. L., Rowlands, D. 1996. Chimeric hepatitis B virus core particles as probes for studying peptide-integrin interactions. *J. Virol.* **70**: 4045–4052.
- Feliu, J. X., Villaverde, A. 1994. An optimized ultrasonication protocol for bacterial cell disruption and recovery of β -galactosidase proteins. *Bio-tech. Tech.* **8**: 509–514.
- Harrison S. C. 1989. Finding the receptors. *Nature* **338**: 205–206.
- Goldman, M. J., Wilson, J. M. 1995. Expression of $\alpha_v\beta_3$ integrin is necessary for efficient adenovirus-mediated gene transfer in the human airway. *J. Virol.* **69**: 5951–5958.
- Hart, S. L., Knight, A. M., Harbottle, R. P., Mistry, A., Hunger, H. -D., Cutler, D. F., Williamson, R., Coutelle, C. 1994. Cell binding and internalization by filamentous phage displaying a cyclic Arg-Gly-Asp-containing peptide. *J. Biol. Chem.* **269**: 12468–12474.
- Jackson, T., Ellard F. M., Ghazaleh, R. A., Brookes, S. M., Blakemore, W. E., Corteyn, A. H., Stuart, D. I., Newman, J. W. I., King, A. M. Q. 1996. Efficient infection of cells in culture by type O foot-and-mouth disease virus requires binding to cell surface heparan sulfate. *J. Virol.* **70**: 5282–5287.
- Jackson, T., Sharma, A., Ghazaleh, R. A., Blakemore, W. E., Ellard F. M., Simmons, D. L., Newman, J. W. I., Stuart, D. I., King, A. M. Q. 1997. Arginine-glycine-aspartic acid-specific binding by foot-and-mouth disease virus to the purified integrin $\alpha_v\beta_3$ in vitro. *J. Virol.* **71**: 8357–8361.
- Jacobson, R. H., Zhang, X-J., DuBose, R. F., Matthews, B. W. 1994. Three-dimensional structure of β -galactosidase from *E. coli*. *Nature* **369**: 761–766.
- Kotin, R. M. 1994. Prospects for the use of adeno-associated virus as a vector for human gene therapy. *Hum. Gene Ther.* **5**: 793–801.
- Lea, S., Hernández, J., Blakemore, W., Brocchi, E., Curry, S., Domingo, E., Fry, E., Abu-Ghazaleh, R., King, A., Newman, J., Stuart, D., Mateu, M. G. 1994. The structure and antigenicity of a type C foot-and-mouth disease virus. *Structure* **2**: 123–139.
- Leippert, M., Beck, E., Weiland, F., Pfaff, E. 1997. Point mutations within the β G- β H loop of foot-and-mouth disease virus O₁K affect virus attachment to target cells. *J. Virol.* **71**: 1046–1051.
- Martínez, M. A., Verdaguer, N., Mateu, M. G., Domingo, E. 1997. Evolution subverting essentiality: Dispensability of the cell attachment Arg-Gly-Asp motif in multiply passaged foot-and-mouth disease virus. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **94**: 6798–6802.
- Mateu, M. G., Martínez, M. A., Capucci, L., Andreu, D., Giral, E., Brocchi, E., Domingo, E. 1990. A single amino acid substitution affects multiple overlapping epitopes in the major antigenic site of foot-and-mouth disease virus of serotype C. *J. Gen. Virol.* **71**: 629–637.
- Mateu, M. G., Veleron, M. L., Andreu, D., Domingo, E. 1996. Systematic replacement of amino acid residues within an Arg-Gly-Asp-containing loop of foot-and-mouth disease virus and effect on cell recognition. *J. Biol. Chem.* **271**: 12814–12819.
- McKenna, T. S. C., Lubroth, J., Rieder, E., Baxt, B., Mason, P. W. 1995. Receptor binding site-deleted foot-and-mouth disease (FMD) virus protects cattle from FMD. *J. Virology* **69**: 5787–5790.
- McLachlin, J. R., Cornetta, K., Eglitis, M. A., Anderson, W. F. 1990. Retroviral-mediated gene transfer. *Prog. Nucleic Acid. Res. Mol. Biol.* **38**: 91–135.
- Miller, J. H. 1972. Experiments in molecular genetics, pp. 352–355. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, New York.
- Nolan, G. P. 1997. Harnessing viral devices as pharmaceuticals: Fighting HIV-1's fire with fire. *Cell* **90**: 821–824.
- Pierschbacher, M. D., Ruoslahti, E. 1987. Influence of stereochemistry of the sequence Arg-Gly-Asp-Xxx on binding specificity in cell adhesion. *J. Biol. Chem.* **262**: 17294–17298.
- Rosenfeld, M. A., Yoshimura, K., Trapnell, B. C., Yoneyama, K., Rosenthal, E. R., Dalemans, W., Fukayama, M., Bargon, J., Stier, L. E., Stratford-Perricaudet, M., Guggino, W. B., Pavirani, A., Lecoq, J.-P., Crystal, R. G. 1992. *In vivo* transfer of the human cystic fibrosis transmembrane conductance regulator gene to the airway epithelium. *Cell* **68**: 143–155.
- Ruoslahti, E., Pierschbacher, M. D. 1987. New perspectives in cell adhesion: RGD and integrins. *Science* **238**: 491–497.
- Sa-Carvalho, D., Rieder, E., Baxt, B., Rodarte, R., Tanuri, A., Mason, P. W. 1997. Tissue culture adaptation of foot-and-mouth disease virus selects viruses that bind to heparin and are attenuated in cattle. *J. Virol.* **71**: 5115–5123.

- Sobrinho, F., Dávila, M., Ortín, J., Domingo, E. 1983. Multiple genetic variants arise in the course of replication of foot-and-mouth disease virus in cell culture. *Virology* **128**: 310–318.
- Studier, F. W., Moffat, B. A. 1986. Use of the bacteriophage T7 RNA polymerase to direct selective high-level expression of cloned genes. *Journal of Molecular Biology* **187**: 37–44.
- Ullmann, A. 1992. Complementation in β -galactosidase: From protein structure to genetic engineering. *BioEssays* **14**: 201–205.
- Ullmann, A. 1984. One-step purification of hybrid proteins which have β -galactosidase activity. *Gene* **29**: 27–31.
- Vidal, M. Cairó, J., Mateu, M. G., Villaverde, A. 1991. Molecular cloning and expression of the VP1 gene of foot-and-mouth disease virus C1 in *E. coli*: Effects on bacterial cell viability. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **35**: 788–792.
- Villaverde, A., Feliu, J. X., Harbottle, R. P., Benito, A., Coutelle, C. 1996. A recombinant, arginine-glycine- aspartic acid (RGD) motif from foot-and-mouth disease virus binds mammalian cells through vitronectin and, to a lower extent, fibronectin receptors. *Gene* **180**: 101–106.
- Wickham, T. J., Mathias, P., Nemerow, G. R. 1993. Integrins $\alpha v \beta 3$ and $\alpha v \beta 5$ promote adenovirus internalization but not virus attachment. *Cell* **73**: 309–319.
- Wickham, T. J., Carrion, M. E., Kovesdi, I. 1995. Targeting of adenovirus penton base to new receptors through replacement of its RGD motif with other receptor-specific peptide motifs. *Gene Ther.* **2**: 750–756.
- Wickham, T. J., Tzeng, E., Shears, L. L. 2nd, Roelvink P. W., Li, Y., Lee, G. M., Brough D. E., Lizonova A., Kovesdi, I. 1997. Increased in vitro and in vivo gene transfer by adenovirus vectors containing chimeric fiber proteins. *J. Virol.* **71**: 8221–8229.
- Yang, Y., Li, Q., Ertl, H. C. J., Wilson, J. M. 1995. Cellular and humoral immune responses to viral antigens create barriers to lung-directed gene therapy with recombinant adenoviruses. *J. Virol.* **69**: 2004–2015.

TREBALL II

EXPLOITING VIRAL CELL-TARGETING ABILITIES IN A SINGLE POLYPEPTIDE,
NON-INFECTIOUS, RECOMBINANT VEHICLE FOR INTEGRIN-MEDIATED
DNA DELIVERY AND GENE EXPRESSION

Anna Arís, Jordi X. Feliu, Andrew Knight, Charles Coutelle, Antonio Villaverde

Biotechnology and Bioengineering, Vol. 68, No.6, June20, 2000

Aquest treball i el factor d'impacte de la revista en la que està publicat han estat utilitzats per complir la normativa de presentació de la tesi doctoral com a un compendi de publicacions. Els resultats que s'hi detallen fan referència a la construcció de la proteïna multifuncional 249AL, que ha estat dissenyada per dirigir processos de transferència gènica mediada per receptor. A relacions òptimes entre aquesta proteïna i plasmidis codificants pel gen marcador de la luciferasa, es formen complexos estables capaços de transfectar cultius cel·lulars *in vitro*. La comparació d'aquests resultats amb els obtinguts amb liposomes catiònics permet aprofundir en l'estudi de la transferència gènica portada a terme per aquesta nova generació de vectors no vírics basats en proteïnes quimèriques recombinants.

Exploiting Viral Cell-Targeting Abilities in a Single Polypeptide, Non-Infectious, Recombinant Vehicle for Integrin-Mediated DNA Delivery and Gene Expression

Anna Aris,¹ Jordi X. Feliu,¹ Andrew Knight,² Charles Coutelle,² Antonio Villaverde¹

¹*Institut de Biologia Fonamental and Departament de Genètica i Microbiologia, Universitat Autònoma de Barcelona, 08193 Bellaterra, Barcelona, Spain; telephone: +34 9358 12148; fax: +34 9358 12011; e-mail: Antoni.Villaverde@uab.e*

²*Division of Biomedical Sciences, Section of Molecular Genetics, Imperial College, BMS Building, South Kensington, London SW7 2AZ, United Kingdom*

Received 8 August 1999; accepted 9 January 2000

Abstract: A recombinant, multifunctional protein has been designed for optimized, cell-targeted DNA delivery and gene expression in mammalian cells. This hybrid construct comprises a viral peptide ligand for integrin $\alpha_v\beta_3$ binding, a DNA-condensing poly-L-lysine domain, and a complete, functional β -galactosidase protein that serves simultaneously as purification tag and DNA-shielding agent. This recombinant protein is stable; it has been produced successfully in *Escherichia coli* and can be purified in a single step by affinity chromatography. At optimal molar ratios, mixtures of this vector and a luciferase-reporter plasmid form stable complexes that transfect cultured cells. After exposure to these cell-targeted complexes, steady levels of gene expression are observed for more than 3 days after transfection, representing between 20 and 40% of those achieved with untargeted, lipid-based DNA-condensing agents. The principle to include viral motifs for cell infection in single polypeptide recombinant proteins represents a promising approach towards the design of non-viral modular DNA transfer vectors that conserve the cell-targeting specificity of native viruses and that do not need further processing after bioproduction in a recombinant host. © 2000 John Wiley & Sons, Inc. *Biotechnol Bioeng* **68**: 689–696, 2000.

Keywords: RGD; FMDV; cell targeting; integrin; oligo-lysine; recombinant protein

INTRODUCTION

We previously demonstrated that a recombinant peptide that reproduces the foot-and-mouth disease (FMDV) cell ligand and is positioned on the surface of a recombinant enzyme, is able to enter into target cells through binding of the in-

tegrin $\alpha_v\beta_3$ (Villaverde et al., 1996; 1998), the presumed receptor of FMDV (Berinstein et al., 1995; Jackson et al., 1997; Neff et al., 1998). This observation prompted us to explore the potential of multifunctional recombinant proteins containing such short-cell-binding ligands further. In particular, we were interested in their potential to mediate cellular delivery of complexed DNA molecules and subsequently, express a reporter gene. Because the viral vectors used for DNA transfer exhibit limitations in their general use, such as the potential for mutagenesis, induction of toxic or immunological reactions or the reversion to replication competence, non-viral delivery systems are acquiring increasing interest as alternative vehicles for gene therapy. Such vectors are usually prepared chemically by covalent linkage of monofunctional components, to produce DNA-binding structures with cell-targeting properties. Cell targeting by these vehicles is provided, among others, by antibodies (Ahmad et al., 1993), integrin-binding peptides (Hartbottle et al., 1998), invasin-based ligands (Paul et al., 1997) and hormones (Sosnowski et al., 1996).

We reasoned that the design of a single recombinant polypeptide, containing the individual modules required for targeted DNA transfer and easy bioproduction and purification, would represent an important step forward towards the development of a novel biotechnologically produced non-viral vector. An important element of such vector would be the incorporation of defined virally derived cell-targeting peptide sequences that, however, carry no risk of contamination by infectious material. Such an approach requires an integration of concepts derived from protein engineering, virology, cell biology, and applied microbiology, to overcome common obstacles, such as the lack of targeting specificity, poor efficiency of gene expression, and low stability or yield of the vector protein. Here, we describe

Correspondence to: Antonio Villaverde

Contract grant sponsors: CICYT; M^a Francesca de Roviralta Foundation

Contract grant numbers: BIO98-0527

such a multidisciplinary approach to develop a new cell-targeting, recombinant-prototype protein for gene transfer. The promising biological properties of this virally based but essentially non-viral vehicle suggest further exploration of the modular concept of targeting and DNA delivery.

MATERIALS AND METHODS

DNA Cloning

Plasmid pJX249A encodes a genetically engineered *E. coli* β -galactosidase in which a 27 aa FMDV peptide has been accommodated between residues 249 and 250 (Feliu and Villaverde, 1998). This protein binds mammalian cells with an efficiency that is comparable to that previously determined by related β -galactosidase constructs (Feliu et al., 1998; Villaverde et al., 1996). The DNA segment encoding the recombinant gene was removed at the flanking *NcoI* and *EcoRI* sites, and after filling in the overhanging ends with the DNA pol I Klenow fragment, it was ligated to *SmaI*-digested, Ap^R pTrC99A (Hanahan, 1983). In the resulting construct, pTrC249A, the mutant *lacZ* gene was not in frame with the methionine initiation codon, and the transforming MC1061 *E. coli* colonies showed pale blue color on X-gal plates. Two partially complementary oligonucleotides (5'-ATTTGAAAAAAAAAGAAAAAAAAAGAAAAAAAAAAAAGCTTCGGTAC-3' and 5'-CGAAGCTTTTTTTTTT-TTCTTTTTTTTCTTTTTTTTC-3'), were designed to encode a 10-lysine peptide. Once hybridized, the DNA segment exhibits an internal *HindIII* restriction site which is useful for screening. The overhanging ends permitted its in frame insertion into pTrC249A after digestion with *KpnI* and *EcoRI*. The final construct pTrC249AL was selected from transformed MC1061 blue colonies on X-gal plates, and further checked by endonuclease restriction. Schematic drawings of pTrC249AL and protein 249AL are shown in Figure 1.

Protein Production and Purification

Production of the recombinant protein 249AL was induced by adding 1 mM IPTG to MC1061/pTrC249AL cultures growing exponentially in LB medium (Maniatis et al., 1982) in the presence of 100 μ g/mL ampicillin. Four hours after IPTG addition, cells were harvested by centrifugation at 5700 g for 15 min at 4°C and the pellets frozen at -80°C until processing. After melting, cells were resuspended in 3 volumes of sonication buffer (0.02M Tris, 0.01M MgCl₂, 1 mM protease inhibitor PMSF, pH 7.2) and disrupted with a Labsonic 2000 sonicator under conditions optimized as described (Feliu et al., 1998). Briefly, a medium-sized titanium probe was applied at 50 W during 15 min at 4°C, with 0.5 s-cycles of alternate sonication and resting. Cell extracts were clarified by centrifugation at 19,900 g for 15 min at 4°C. Cell debris were resuspended and resonicated under the same conditions for 5 additional minutes. Pooled super-

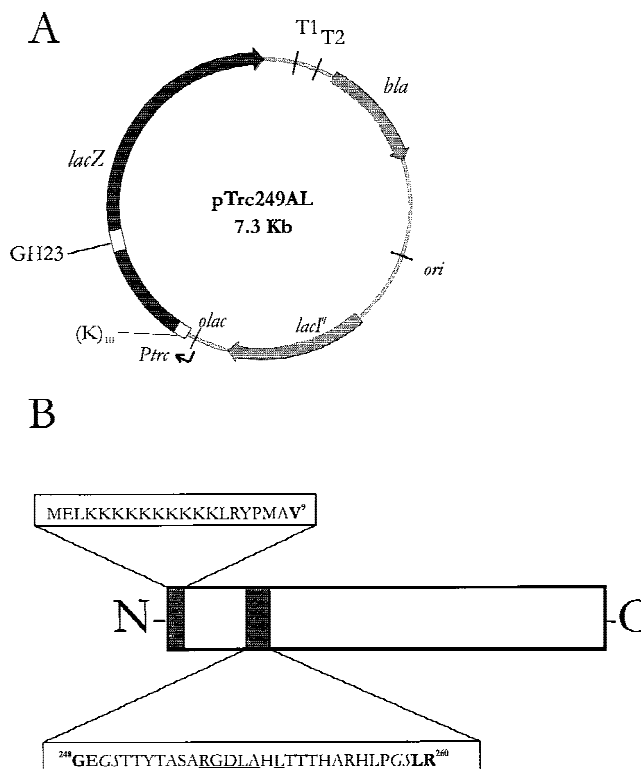


Figure 1. (A) Schematic drawing of pTrc249AL, showing the *lacZ* gene, the inserted GH23-encoding DNA segment and the 5'-fused (K)₁₀-encoding region. T1 and T2 are transcriptional terminators from the *E. coli* *rrnB* gene. (B) Representation of protein 249AL, showing the approximate positions of both the DNA-condensing domain (N-terminal box) and the FMDV-cell-binding motif (internal box). Amino acid segments of these two added peptides are shown. Figures indicate amino acid residues of the *E. coli* β -galactosidase flanking the heterologous stretches (in bold). In the integrin-binding domain, residues shown in italics have been introduced by the cloning procedure, and they are not present in the viral VP1 protein. The underlined positions are those involved in cell attachment during FMDV infection (Mateu et al., 1996).

natants were cleared again and submitted to affinity chromatography on Sepharose-TPGE columns as described (Benito et al., 1995). Elution fractions showing β -galactosidase enzyme activity (measured by ONPG hydrolysis) were pooled and dialyzed against Hepes-buffered saline pH 7.2. More than 10 mg of 249AL per liter of bacterial culture were easily obtained by this standard procedure. The purified protein was submitted to N-terminal microsequencing to assess the presence and integrity of the poly-lysine tail. The N-terminal peptide (N-MELKKKKKK) was identical with that predicted from the cloning strategy (Fig. 1). The parental JX249A and the pseudo-wild-type LACZ protein from which JX249A derives (Feliu and Villaverde, 1998) were produced in CI857^{ts}-controlled heat-inducible expression systems and purified as indicated above.

Characterization of 249AL and 249AL-DNA Complexes

Temperature stability of 249AL, LACZ, and JX249A as well as their intrinsic fluorescence were determined as de-

scribed (Feliu and Villaverde, 1998). Stability against urea was determined by incubating 20 pmols of each purified protein with increasing concentrations of the denaturing agent in Z buffer (Miller, 1972) at 28°C for 2 h, and determining the specific activity of the enzyme after 10-fold dilution of the samples in Z buffer. The specific activity of these proteins was measured *in vivo* by Western blot analysis of cell extracts and independent enzymatic determination (Benito et al., 1996). Trypsinized HeLa (human cervical epithelial) cells were used to analyze cell-binding specificity and to compare cell binding of LACZ, JX249A, and 249AL proteins. The cell-binding assay was described in detail elsewhere (Villaverde et al., 1996; 1998). Synthetic peptides used for competition were GPenGRGDSPCA, that inhibits cell binding to vitronectin (Pierschbacher and Ruoslahti, 1987), GRGDSP, that inhibits cell binding to both fibronectin and vitronectin (Pierschbacher and Ruoslahti, 1987) and the negative control GRGESP (Pierschbacher and Ruoslahti, 1984) (all from Gibco BRL). Four independent analyses were performed on each sample. Internalization of active protein was determined as follows. HeLa cells were grown up to 80% confluence in DMEM plus Glutamax and 10% fetal calf serum in 96-well tissue culture-grade microplates. One set of plates was pre-incubated at 4°C and another at 37°C. At 4°C, integrin-dependent binding occurs as at 37°C but internalization is prevented (Wickham et al., 1993). After removing the medium, 20 pmols of either 249AL or LACZ were added to each assay well in 50 µL PBS and the plates further incubated at the same temperature. For background determination, several wells were also incubated with buffer containing no protein. At different incubation times, cells were washed 3 times with PBS, and 50 µL of lysis buffer was finally added (0.1% Triton X-100, 250 mM Tris-HCl, pH 8). Then, the total, β-galactosidase activity was measured as described previously (Villaverde et al., 1998).

Plasmid DNA was extracted by the standard alkaline lysis procedure from *E. coli* DH5α and purified using Qiagen columns (Qiagen, Chatsworth, CA) and the Endotoxin Extraction Kit (also from Qiagen). For analytical purposes, protein-DNA complexes were prepared by mixing 0.375 µg of pUC18 with different amounts of 249AL in 90 µL of Hepes-buffered saline. After incubation for 30 min at room temperature, 40 µL of each sample were analyzed for gel-retardation on 0.8% agarose gels to establish the minimal amount of protein required to fully impede DNA mobility (one retardation unit).

Measurement of Gene Expression

The vector pGL3 (Promega, Madison, WI), carrying the American firefly (*Phonitus pyralis*) luciferase gene under control of the SV40 promoter and SV40 enhancer element was used as reporter gene to monitor efficient DNA transfection. DNA-249AL and DNA-Liposome complexes were prepared by incubating 1 µg plasmid DNA with either different amounts of 249AL or 12 µg of LipofectAMINE™

(Gibco-BRL) in 200 µL of serum-free OptiMem medium (both from Gibco-BRL, Life Technologies, Inc., Rockville, MD), for 60 min at room temperature. CaCo-2 (human colonic epithelial) cells were grown in 24-well plates to 50% confluence. Then, cells were washed and further incubated for 30 min at 37°C in 500 µL OptiMem. The media was removed, and the DNA complexes added in a total volume of 200 µL per well. After time-limited exposure (usually ranging between 6 and 12 h), the DNA-containing media was removed. Then, 1 mL of Glutamax-containing Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM), supplemented with fetal calf serum (20%) and penicillin-streptomycin (100 units/mL each) were added to each well. After 48 h of further incubation, cells were washed with PBS and harvested in 200 µL of reporter lysis buffer (Promega). Luciferase activity was measured in cell extracts with either LS800 canthos or LB9501N (Nichols Institute Diagnostic) luminometers by standard procedures (Harbottle et al., 1998). All transfections were done in quadruplicate. Total protein was determined by the micro-BCA bichinonic acid protein assay kit (Pierce, Rockford, IL). For the particular kinetics shown in Figure 5A, cultured cells were exposed to either LipofectAMINE™- or protein-DNA complexes for different times, then washed and further incubated in culture medium as described above, to allow gene expression. For a better comparison of the results, the complete expression time was 48 h in all cases, starting with the addition of the complexes at time 0.

RESULTS

Design and Production of the Cell Targeting and DNA Binding β-Galactosidase Protein 249AL

We have previously constructed a β-galactosidase-derived, multidomain JX249A protein displaying the arg-gly-asp (RGD) cell-attachment motif on a solvent exposed loop (Feliu and Villaverde, 1998). Like closely related constructs presenting the same FMDV peptide, JX249A binds efficiently to target mammalian cells through the RGD motif (Feliu et al., 1998; Villaverde et al., 1996). This construct was further modified by genetic engineering through addition of a DNA-binding, K₁₀ (oligolysine) peptide to its amino terminus. Although lysine-based peptides functioning as DNA-condensing elements are commonly incorporated by chemical coupling into DNA-delivery vectors, no stable recombinant proteins displaying such functional peptides have been obtained until now. However, the resulting 249AL protein (Fig. 1) was produced without any signs of proteolysis in recombinant *E. coli* cultures at yields indistinguishable from those of the parental LACZ and JX249A proteins, and these three polypeptides were purified by affinity chromatography with similar efficiency (not shown). This indicates that the simultaneous presence of the DNA-binding and cell-attachment motifs in a recombinant β-galactosidase does not render it toxic for the producing bac-

teria. In addition, tryptophan fluorescence as well as the temperature stability of the engineered β -galactosidase are not changed in the presence of the DNA-binding peptide, 249AL shows even a slightly enhanced recovery from urea denaturation compared with the parental JX249A (Table I). Further, the specific activities of both JX249A and 249AL are not dramatically reduced in comparison to that of LACZ (Table I). Altogether, these results demonstrate that no important distortions of the β -galactosidase structure are induced on 249AL by accommodation of the oligolysine peptide, which is stable once expressed in the fusion protein as proven by N-terminal amino acid sequencing (not shown).

Multifunctional Properties of the Chimeric 249AL

The ability of 249AL to interact with DNA was assessed by a DNA-retardation assay. The results confirmed that the N-terminal oligolysine tail was exposed sufficiently well on the β -galactosidase surface to bind purified plasmid tightly and to restrict its mobility in agarose gels (Fig. 2). One μg of DNA is completely retarded by 12.0 μg (103.2 pmols) of 249AL protein (1 retardation unit), but not by the same or even higher amounts of control JX249A and LACZ proteins lacking the DNA-binding motif (Fig. 2). Peptide RGD(K)₁₆ was also included as a positive control.

To confirm that the addition of the oligolysine motif at the N-terminus of JX249A does not alter the cell-binding properties of this protein (Feliu and Villaverde, 1998; Feliu et al., 1998), comparative experiments were carried out with JX249A and 249AL. HeLa cells display the integrin $\alpha_v\beta_3$ on their surface which is the *in vivo* target for FMDV. Although viral multiplication in this cell line is not efficient (Berinstein et al., 1995), we have used these cells as convenient models to explore cell adhesion (Feliu et al., 1998; Villaverde et al., 1996; 1998). In Figure 3 it is shown that there are very similar cell-binding profiles for both proteins. It is noteworthy that further engineering of JX249A by the addition of the DNA-binding peptide does not alter the integrin specificity of the accommodated FMDV peptide (Fig. 3A). The slight increase in the minimal amount of 249AL required for cell attachment (Figure 3 B) could indicate that in a fraction of this protein cell binding is less efficient. Aggregation of some protein molecules could account for this difference, which would be in agreement with a slight

Table I. Stability, tryptophan fluorescence and enzymatic activity of LACZ, JX249A and 249AL proteins.

Protein	Urea stability ^a (M _{50%})	Thermal stability ^b (t _{50%} , min)	λ_{max} (nm)	Specific activity (U/ μg)
LACZ	2.722 \pm 0.072	153.3 \pm 7.9	340.5 \pm 0.75	6771 \pm 43
JX249A	1.881 \pm 0.019	10.5 \pm 0.8	341.0 \pm 0.25	3232 \pm 528
249AL	2.107 \pm 0.026	9.0 \pm 1.5	341.0 \pm 1.00	2627 \pm 293

^aUrea molar concentration reducing by 50% the enzymatic activity of the sample.

^bIncubation time at 50°C reducing by 50% the enzymatic activity of the sample.

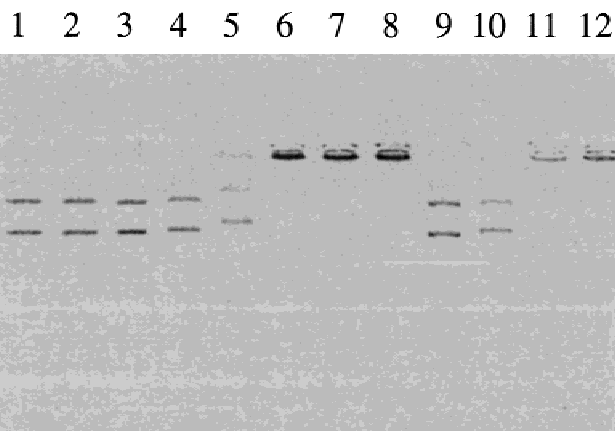


Figure 2. Retardation of electrophoretic mobility of pUC18 complexed with increasing amounts of 249AL. Plasmid DNA was mixed with 249AL at either 4 (lane 4), 8 (lane 5), 12 (lane 6), 16 (lane 7) or 32 (lane 8) μg of purified 249AL per μg of DNA. Lanes 1 and 2 show running of DNA incubated with 32 μg of JX249A and LACZ proteins, respectively, per μg of DNA, and lanes 10, 11 and 12 with 0.4, 0.6, and 0.8 μg of peptide RGD(K)₁₆ per μg of DNA. Lanes 3 and 9 show migration of protein-free plasmid DNA.

turbidity observed in some samples of purified 249AL (but not JX249A) protein.

The cellular uptake of 249AL was assessed by comparing the β -galactosidase enzymatic activity retained by HeLa cells, under conditions permitting or preventing integrin-mediated internalization, as previously reported for other recombinant proteins carrying the FMDV RGD motif (Villaverde et al., 1998). Active, internalized 249AL was detected both at 30 and 120 min after addition to cultured cells (Fig. 3C), proving that the enzyme is stable and enzymatically active during its intracellular transport.

Gene Expression Directed by 249AL-Delivered DNA

After demonstrating internalization of active 249AL protein (Fig. 3C), and its ability to bind and condense DNA (Fig. 2), we decided to test the efficiency of this construct as a targeting vehicle for DNA delivery. Although FMDV binding to HeLa cells is efficient, multiplication of this virus in this cell line is not detected (Berinstein et al., 1995). Therefore, to avoid possible internalization problems, human CaCo-2 cells, which have been proven to be useful to evaluate RGD-mediated, cell-targeted DNA transfer (Harbottle et al., 1998) were chosen for this assay. The chemically synthesized RGD-oligolysine peptide (Harbottle et al., 1998), an established integrin-targeting delivery system was used for comparison with the 249AL-DNA complexes generated at different mixing ratios. Luciferase reporter gene expression mediated by the recombinant protein was up to 3 times higher than that of the synthetic peptide at 2 retardation units (Fig. 4A), the conditions optimized for the peptide-based complexes (Harbottle et al., 1998). However, further optimization of this system showed that the optimum transfection efficiency for this recombinant vector is around 3

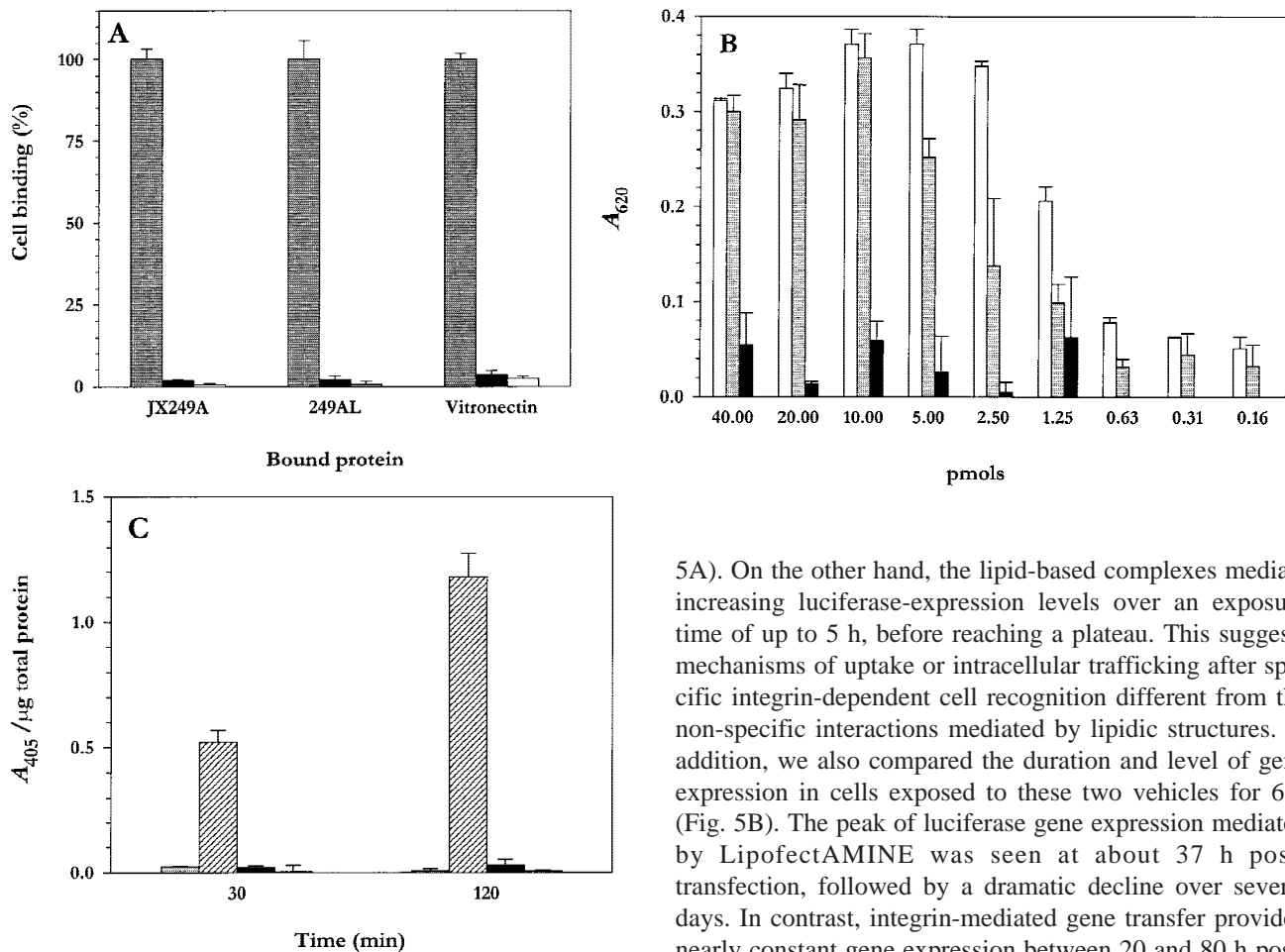


Figure 3. (A) Inhibition of HeLa cell binding to JX249A, 249AL and vitronectin by synthetic peptides GRGDSP (black bar), *G*PenGRGDSPCA (white bar) and the control GRGESP (grey bar). (B) HeLa cell-binding promoted by different amounts of JX249A (white bars), 249AL (grey bars) and LACZ (black bars). (C) Total β -galactosidase activity retained by HeLa cells after incubation with purified proteins at either 4 or 37°C. The experiment was done with 249AL (at 4°C, white bars; at 37°C, dashed bars) and LACZ (at 4°C, black bars; at 37°C, grey bars). Note that the specific β -galactosidase activity of 249AL is lower than that of LACZ (Table I).

retardation units (36 μ g of 249AL per μ g of DNA), reaching gene-expression levels 10 times above those of the peptide-based complexes (Fig. 4B). This demonstrates a promising potential for the recombinant polypeptide strategy of targeted non-viral vector systems. It is likely that the higher molecular mass of the protein could contribute to a higher degree of protection of the nucleic acid into a shielded core during transport, rendering it more efficient for gene transfer and expression in comparison to short-peptide vehicles.

To analyze further the delivery process mediated by 249AL, we investigated the influence of the contact time between the DNA-protein complexes and the target cells on the pattern of gene expression compared to that of the highly efficient non-targeting LipofectAMINE-DNA complexes. For protein-packaged DNA, maximum expression levels are reached after 90 min of cell contact and stay constant at increasing contact times up to at least 16 h (Fig.

5A). On the other hand, the lipid-based complexes mediate increasing luciferase-expression levels over an exposure time of up to 5 h, before reaching a plateau. This suggests mechanisms of uptake or intracellular trafficking after specific integrin-dependent cell recognition different from the non-specific interactions mediated by lipidic structures. In addition, we also compared the duration and level of gene expression in cells exposed to these two vehicles for 6 h (Fig. 5B). The peak of luciferase gene expression mediated by LipofectAMINE was seen at about 37 h post-transfection, followed by a dramatic decline over several days. In contrast, integrin-mediated gene transfer provided nearly constant gene expression between 20 and 80 h post-transfection albeit at between 5- and 2.5-fold lower level. These results may indicate that the nature of the vehicle is critical for the kinetics of DNA release and gene expression. The more steady, though lower levels of gene expression promoted by the protein DNA-transfer vehicles could be due to a lesser amount of internalized DNA combined with a higher protection which increases its stability. Moreover, the protein pseudo-capsids could require further destabilization to release the DNA and allow transcription, which may, therefore, take place progressively over a longer period of time.

DISCUSSION

Protein JX249A is a chimeric β -galactosidase displaying the arg-gly-asp (RGD) cell-attachment motif of FMDV on a solvent-exposed loop of the enzyme (Feliu and Villaverde, 1998). The peptide also contains several B-cell epitopes involving the RGD tripeptide, which defines the major antigenic site of FMDV serotype C1 (Mateu et al., 1990). Accommodated in this particular position of *E. coli* β -galactosidase (between amino acid residues 249 and 250), it renders a construct that is significantly more stable than related engineered proteins presenting the same viral segment at different regions of the bacterial enzyme (Feliu and Villaverde, 1998), and it also mediates binding to FMDV target cells with higher efficiency (Villaverde et al., 1996;

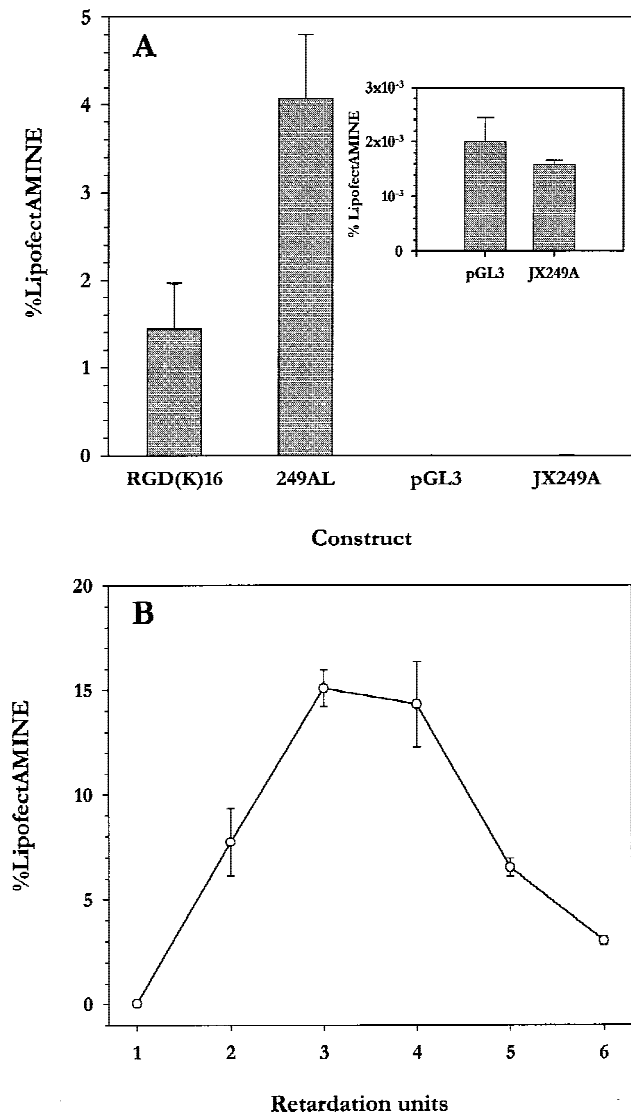


Figure 4. (A) Luciferase gene expression in CaCo2 cells after transfection with pGL3-protein complexes, relative to that obtained with LipofectAMINE™ Two retardation units were used for both RGD(K)₁₆ (2.5 μg/μg DNA or 0.8 nmols/μg DNA) and for 249AL (24 μg/μg DNA or 0.2 nmols/μg DNA), the optimum ratio shown for RGD(K)-mediated transfection (Harbottle et al., 1998). Protein JX249A was used at the same ratio as a control. Cells were exposed overnight to the complexed DNA, and gene expression was determined after 48 h. An amplified scale is shown for pGL3 and JX249A in the small window. (B) Efficiency of 249AL-mediated gene expression at different DNA-protein ratios. Exposure time 6 h. Relative light units (RLU) per minute for LipofectAMINE-mediated gene expression were 497747360 and 272220367 for panels A and B respectively.

1998). The antigenic similarity of JX249A and FMDV particles (Carbonell et al., 1998), suggests that the presentation of the viral segment on the enzyme surface in this chimeric protein resembles its natural location in protein VP1 on the virion surface. Therefore, the good cell-binding properties exhibited by JX249A and 249AL proteins may rely on a satisfying conformational mimicry of the viral ligand, as constricted by its specific insertion site at position 249.

Recent research on the identification of the FMDV re-

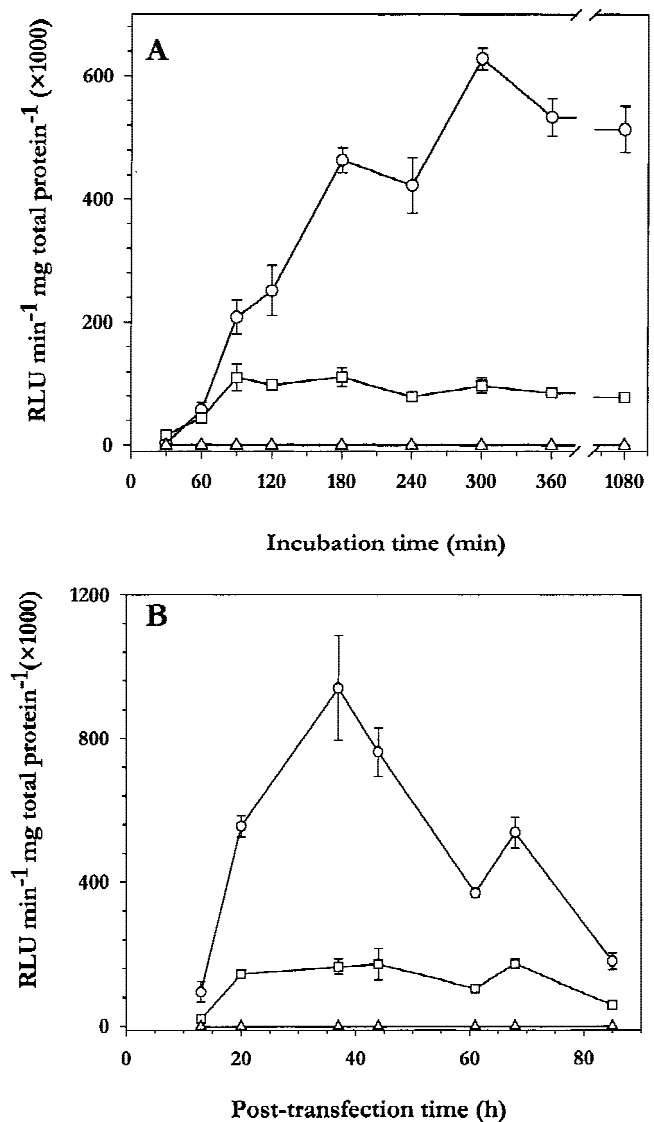


Figure 5. (A) Levels of gene expression in CaCo2 cells at different times of exposure to DNA protected by either LipofectAMINE™ (circles) or 249AL (squares). Protein JX249A (triangles) was also used as a control. 249AL was employed at 3 retardation units, and the same protein amount of JX249A was also used in the mixtures. Gene expression was analyzed 48 h after washing. (B) Duration of luciferase gene expression after transfection, with a cell-contact time of 6 h. Gene expression is presented as RLU measured during 1 min and corrected by total protein.

ceptor strongly points to integrin $\alpha_V\beta_3$ as the main attachment site for the virus during natural infection (Neff et al., 1998, and references therein). This integrin is also the main receptor for recombinant β -galactosidases displaying the viral RGD motif (Villaverde et al., 1996), which confers the cell-targeting properties to the carrier proteins. Integrin $\alpha_V\beta_3$, although quite ubiquitous in mammal tissues, has been shown to be important in angiogenesis (Brooks et al., 1994a) and $\alpha_V\beta_3$ -targeting peptides have antitumoral effects by causing apoptosis of angiogenic blood vessel cells (Brooks et al., 1994b, Brooks et al., 1995). Further, phage-carrying integrin-binding ligands with $\alpha_V\beta_3$ -specific RGD motifs accumulated in tumors upon injection in animals

(Arap et al., 1998; Pasqualini et al., 1997). Altogether, these data suggest a high potential of this integrin as a target for anti-tumoral drug development. Viral protein sequences, which are exposed to constant selective pressures to optimize binding to specific receptors, might be more promising regarding their potential for cell targeting than phage-displayed integrin-binding peptides, selected from random peptide libraries after a few rounds of panning-amplification (Koivunen et al., 1994; Pasqualini et al., 1995).

Further, the tolerance of JX249A to the fusion of a polylysine tail, and the DNA-transferring abilities of 249AL protein, warrants further exploration of the modular principle for the construction and bioproduction of new recombinant gene-delivery vehicles, in which the targeting properties are conferred by a viral peptide and into which a lysosome-disrupting module could be included. The molecular mechanisms of nuclear delivery of the complexed DNA remain unclear. However, the efficiency of gene expression by 249AL is about 10-fold above that obtained by using related synthetic peptides (Fig. 4), suggesting that the higher molecular mass of *E. coli* β -galactosidase may be more protective against cell nucleases than the short peptide. Alternatively, unidentified bacterial or viral regions contained in 249AL could act as nuclear targeting signals. Accordingly, it has been shown that native β -galactosidase is not completely excluded from the cell nucleus in trafficking experiments, suggesting that domains from this enzyme could eventually exhibit nuclear targeting activities (Kalderson et al., 1984). In addition, 249AL-DNA complexes are internalized with high efficiency, mediating steady gene-expression levels over at least 4 days post-transfection (Fig. 5B).

In summary, protein 249AL is the first example for the design and bioproduction of a modular but single and stable recombinant polypeptide exhibiting the multiple properties required for gene transfer vector. These features include targeting specificity, DNA binding, condensation, and nuclear delivery, this protein also containing a useful purification tag. Our results demonstrate that the construction of multi-domain single polypeptides may be a valid strategy for the further development of nonviral vehicles for gene transfer and expression.

We are indebted to E. Brocchi, E. Domingo, and M.G. Mateu for generously providing useful anti-FMDV monoclonal antibodies, and to F. Canals, F. García, J. Checa and V. Ferreres for technical assistance. A.A. and J.X.F. were recipients of Predoctoral Fellowships from MEC and UAB, respectively. Charles Coutelle and Andrew Knight are supported by the CF-Trust/ Muller Bequest, the March of Dimes Foundation, and the MRC.

References

Ahmad I, Longenecker M, Samuel J, Allen TM. 1993. Antibody-targeted delivery of doxorubicin entrapped in sterically stabilized liposomes can eradicate lung cancer in mice. *Cancer Res* 53:1484–1488.

Arap W, Pasqualini R, Ruoslahti E. 1998. Cancer treatment by targeted

drug delivery to tumor vasculature in a mouse model. *Science* 279: 377–380.

Benito A, Feliu JX, Villaverde A. 1995. Peptide insertions in β -galactosidase activating interface can improve binding in TPEG-Sepharose affinity. *Biotechnol Tech* 9:767–770.

Benito A, Feliu JX, Villaverde A. 1996. β -Galactosidase enzymatic activity as a molecular probe to detect specific antibodies. *J Biol Chem* 271:21251–21256.

Berinstein A, Roivainen N, Hovi T, Mason PW, Baxt B. 1995. Antibodies to the vitronectin receptor (integrin alpha V beta 3) inhibit binding and infection of foot-and-mouth disease virus to cultured cells. *J Virol* 69:2664–2666.

Brooks PC, Clark RA, Cheresh DA. 1994a. Requirement of vascular integrin alpha v beta 3 for angiogenesis. *Science* 264:569–571.

Brooks PC, Montgomery AM, Rosenfeld M, Reisfeld RA, Hu T, Klier G. 1994b. Integrin alpha v beta 3 antagonists promote tumor regression by inducing apoptosis of angiogenic blood vessels. *Cell* 79: 1157–1164.

Brooks PC, Stromblad S, Klemke R, Visscher D, Sarkar FH, Cheresh DA. 1995. Antiintegrin alpha v beta 3 blocks human breast cancer growth and angiogenesis in human skin. *J Clin Invest* 96:1815–1822.

Carbonell X, Feliu JX, Benito A, Villaverde A. 1998. Display-induced antigenic variation in recombinant peptides. *Biochem Biophys Res Commun* 248:773–777.

Feliu JX, Villaverde A. 1998. Engineering of solvent-exposed loops in *Escherichia coli* β -galactosidase. *FEBS Lett* 434:23–27.

Feliu JX, Benito A, Oliva B, Avilés X, Villaverde A. 1998. Conformational flexibility in a highly mobile protein loop of foot-and-mouth disease virus: Distinct structural requirements for integrin and antibody binding. *J Mol Biol* 283:331–338.

Feliu JX, Cubarsi R, Villaverde A. 1998. Optimized release of recombinant proteins by ultrasonication of *E. coli* cells. *Biotechnol Bioeng* 58: 536–540.

Hanahan D. 1983. Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *J Mol Biol* 166:557–580.

Harbottle RP, Cooper RG, Hart SL, Ladhoff A, McKay T, Knight AM, Wagner E, Miller AD, Coutelle C. 1998. An RGD-oligolysine peptide: A prototype construct for integrin-mediated gene delivery. *Hum Gene Ther* 9:1037–1047.

Jackson T, Sharma A, Ghazaleh RA, Blakemore WE, Ellard FM, Simmons DL, Newman JWI, Stuart DI, King AMQ. 1997. Arginine-glycine-aspartic acid-specific binding by foot-and-mouth disease viruses to the purified integrin alpha(v)beta3 in vitro. *J Virol* 71:8357–8361.

Kalderson D, Roberts BL, Richardson WD, Smith AE. 1984. A short amino acid sequence able to specify nuclear location. *Cell* 39:499–509.

Koivunen E, Wang B, Ruoslahti E. 1994. Isolation of a highly specific ligand for the alpha 5 beta 1 integrin from a phage display library. *J Cell Biol* 124:373–380.

Maniatis D, Sambrook J, Fritsch EF. 1982. *Molecular cloning: A laboratory manual*. Cold Spring Harbor, NY: Cold Spring Harbor Laboratory Press.

Mateu MG, Martínez MA, Capucci L, Andreu D, Giralt E, Brocchi E, Domingo E. 1990. A single amino acid substitution affects multiple overlapping epitopes in the major antigenic site of foot-and-mouth disease virus of serotype C. *J Gen Virol* 71:629–637.

Mateu MG, Veleron ML, Andreu D, Domingo E. 1996. Systematic replacement of amino acid residues within an Arg-Gly-Asp-containing loop of foot-and-mouth disease virus and effect on cell recognition. *J Biol Chem* 271:12814–12819.

Miller JH. 1972. In: *Experiments in molecular genetics*. Cold Spring Harbor, NY: Cold Spring Harbor Laboratory Press. pp 352–355.

Neff S, Sa-Carvalho D, Rieder E, Mason PW, Blystone SD, Brown EJ, Baxt B. 1998. Foot-and-mouth disease virus virulent for cattle utilizes the integrin alpha(v)beta3 as its receptor. *J Virol* 72:3587–3594.

Pasqualini R, Koivunen E, Ruoslahti E. 1997. Alpha v integrins as receptors for tumor targeting by circulating ligands. *Nature Biotech* 15: 542–546

- Pasqualini R, Koivunen E, Ruoslahti E. 1995. A peptide isolated from phage display libraries is a structural and functional mimic of an RGD-binding site on integrins. *J Cell Biol* 130:1189–1196.
- Paul RW, Weisser KE, Loomis A, Sloane DL, LaFoe D, Atkinson EM, Overell RW. 1997. Gene transfer using a novel fusion protein, GAL4/invasin. *Hum Gene Ther* 8:1253–1262.
- Pierschbacher MD, Ruoslahti E. 1984. Cell attachment activity of fibronectin can be duplicated by small synthetic fragments of the molecule. *Nature* 309:30–33.
- Pierschbacher MD, Ruoslahti E. 1987. Influence of stereochemistry of the sequence Arg-Gly-Asp-Xaa on binding specificity in cell adhesion. *J Biol Chem* 262:17294–17298.
- Sosnowski BA, Gonzalez AM, Chandler LA, Buechler YJ, Pierce GF, Baird A. 1996. Targeting DNA to cells with basic fibroblast growth factor (FGF2). *J Biol Chem* 271:33647–33653.
- Villaverde A, Feliu JX, Harbottle R, Benito A, Coutelle C. 1996. A recombinant, arginine-glycine-aspartic acid (RGD) motif from foot-and-mouth disease virus binds mammalian cells through vitronectin and at lower extend fibronectin receptors. *Gene* 180:101–106.
- Villaverde A, Feliu JX, Aris A, Harbottle RP, Benito A, Coutelle C. 1998. A cell adhesion peptide from foot-and-mouth disease virus can direct cell targeted delivery of a functional enzyme. *Biotechnol Bioeng* 59: 249–301.
- Wickham TJ, Mathias P, Nemerow GR. 1993. Integrins alpha v beta 3 and alpha v beta 5 promote adenovirus internalization but not virus attachment. *Cell* 73:309–319.

TREBALL III

MOLECULAR ORGANIZATION OF PROTEIN-DNA COMPLEXES FOR CELL-TARGETED DNA DELIVERY

Anna Arís and Antonio Villaverde

Biochemical and Biophysical Research Communications 278, 455-461 (2000)

Aquest article juntament amb el factor d'impacte de la revista en la que està publicat ha estat utilitzat per complir la normativa de presentació de la tesi doctoral com a un compendi de publicacions. En aquest estudi s'analitza l'organització molecular dels complexos DNA-proteïna mostrant que 249AL forma espontàniament agregats proteics, en un patró dependent de concentració, en els que l'àcid nucleic és incorporat eficientment sense modificar-ne la morfologia ni l'activitat enzimàtica. Tot i que el pèptid RGD es manté igualment exposat i immunoreactiu en tots els complexos estudiats, s'estableix un rang de relació DNA/proteïna en el que hi ha una correlació òptima entre els nivells d'expressió gènica i l'especificitat d'unió a integrines. Aquest fet suggereix la influència del DNA empaquetat en els complexos en el procés de transferència gènica.