

Selección positiva de células modificadas con genes suicidas como estrategia terapéutica contra el cáncer

Jordi Martínez-Quintanilla Martínez

ADVERTIMENT. La consulta d'aquesta tesi queda condicionada a l'acceptació de les següents condicions d'ús: La difusió d'aquesta tesi per mitjà del servei TDX (www.tesisenxarxa.net) ha estat autoritzada pels titulars dels drets de propietat intel·lectual únicament per a usos privats emmarcats en activitats d'investigació i docència. No s'autoritza la seva reproducció amb finalitats de lucre ni la seva difusió i posada a disposició des d'un lloc aliè al servei TDX. No s'autoritza la presentació del seu contingut en una finestra o marc aliè a TDX (framing). Aquesta reserva de drets afecta tant al resum de presentació de la tesi com als seus continguts. En la utilització o cita de parts de la tesi és obligat indicar el nom de la persona autora.

ADVERTENCIA. La consulta de esta tesis queda condicionada a la aceptación de las siguientes condiciones de uso: La difusión de esta tesis por medio del servicio TDR (www.tesisenred.net) ha sido autorizada por los titulares de los derechos de propiedad intelectual únicamente para usos privados enmarcados en actividades de investigación y docencia. No se autoriza su reproducción con finalidades de lucro ni su difusión y puesta a disposición desde un sitio ajeno al servicio TDR. No se autoriza la presentación de su contenido en una ventana o marco ajeno a TDR (framing). Esta reserva de derechos afecta tanto al resumen de presentación de la tesis como a sus contenidos. En la utilización o cita de partes de la tesis es obligado indicar el nombre de la persona autora.

WARNING. On having consulted this thesis you're accepting the following use conditions: Spreading this thesis by the TDX (www.tesisenxarxa.net) service has been authorized by the titular of the intellectual property rights only for private uses placed in investigation and teaching activities. Reproduction with lucrative aims is not authorized neither its spreading and availability from a site foreign to the TDX service. Introducing its content in a window or frame foreign to the TDX service is not authorized (framing). This rights affect to the presentation summary of the thesis as well as to its contents. In the using or citation of parts of the thesis it's obliged to indicate the name of the author.



UNIVERSITAT DE BARCELONA
FACULTAT DE MEDICINA
DEPARTAMENT DE BIOLOGIA CEL.LULAR, INMUNOLOGIA Y NEUROCIÈNCIES
PROGRAMA DE DOCTORAT EN BIOLOGÍA I PATOLOGÍA CEL.LULAR

**SELECCIÓN POSITIVA DE CÉLULAS MODIFICADAS CON
GENES SUICIDAS COMO ESTRATEGIA TERAPÉUTICA
CONTRA EL CÁNCER**

JORDI MARTÍNEZ-QUINTANILLA MARTÍNEZ

Abril, 2010

SELECCIÓN POSITIVA DE CÉLULAS MODIFICADAS CON GENES SUICIDAS COMO ESTRATEGIA TERAPÉUTICA CONTRA EL CÁNCER

Memoria presentada por

Jordi Martínez-Quintanilla Martínez

Becado por la Función Privada Institut d'Investigació Biomèdica de Bellvitge (IDIBELL)

para optar al grado de **Doctor por la Universitat de Barcelona**

Tesis de investigación realizada bajo la dirección del **Dr. Ramon Alemany Bonastre** de
l'Institut Català d'Oncologia englobat en l'Institut d'Investigació Biomèdica de Bellvitge
(ICO-IDIBELL)

Director:

Tutor:

Dr. Ramon Alemany Bonastre

Dr. Carlos Enrich Bastus

Autor:

Jordi Martínez-Quintanilla Martínez

Barcelona, Abril del 2010

A mis padres, Juan y Carmen

No fue fácil decidirse a empezar este largo camino. La primera vez que contacté con Ramon fue en mi cuarto año de carrera, cuando yo buscaba un laboratorio para hacer unas prácticas de verano sobre Terapia Génica. En el momento en el que hice la entrevista con él, supe que no era necesario buscar más. Aún así, en ese momento, yo tenía muy claro que una vez acabada la carrera quería trabajar en una industria farmacéutica.

Ramon, supongo que estarás de acuerdo conmigo en que no fue fácil hacerme cambiar de opinión, pero al final lo conseguiste. Durante esos meses de prácticas, trabajando mano a mano contigo, supiste trasmitirme la importancia de la ciencia que se hace en tu grupo, la finalidad por la que se hace y, sobretodo, a quién va dirigida.

Mi primer agradecimiento es para ti, **Ramon**, por aceptarme como estudiante en prácticas, como técnico, como becario predoctoral y ¿como postdoc? ¡no está nada mal! Gracias por darme todas las facilidades posibles para empezar este largo camino y, sobretodo, por confiar en mí.

Todavía me acuerdo que decías que nos teníamos que aprovechar de la suerte de los principiantes cuando todavía estaba de prácticas. Gracias por elegirme para arrancar un proyecto en el que crees plenamente, aunque muchos piensen que es una locura. Gracias por enseñarme todo lo que sabes, por saber escuchar, por darme siempre buenos consejos y por enseñarme a aprender de los resultados negativos. También quería agradecerte la libertad que me has concedido en esta última etapa del doctorado, que ha permitido acabar de formarme como científico. Gracias por ser más que un director de tesis, más que un jefe, por ser un amigo con el que poder hablar de cualquier cosa. Recuerdo largas charlas en las cenas de grupo donde me demostrabas tu transparencia y generosidad o los partidos de esquaix en los que acababas haciéndome sacar el hígado por la boca.

Realmente, después de todo lo vivido, espero que nuestra relación científica y personal no acabe con esta Tesis Doctoral.

Moltes gràcies, **Manel**, per ensenar-me a treballar al laboratori, a cultius i a l'estabulari. Gràcies per saber tant, per ser l'ajuda que qualsevol becari necessita durant la seva Tesi, i per no importar-te compartir els teus coneixements amb els altres. Realment, et mereixes tot el meu respecte i ets un exemple a seguir en el meu futur.

Gràcies, **Neus**, per ensenar-me durant la primera etapa de la Tesi, per tenir tanta paciència amb mi i aguantar totes les meves preguntes dia rera dia, i per compartir els meus inicis al laboratori.

AGRADECIMIENTOS

Fer bactèries competents a la càmera freda, a part d'ajudar-te a agafar un refredat, també serveix per forjar l'amistat entre dues persones.

Recuerdo como si fuese ayer, la llegada al laboratorio de una licenciada en biología, recién operada del ojo, que quería hacer la tesis con Ramon. Supongo que Neus coincidirá conmigo en que ni las mejores expectativas podrían acercarse a lo que has llegado a ser en este grupo. Gracias, **Alena**, por ofrecerme tu ayuda en todo momento, por enseñarme a trabajar duro para conseguir unos objetivos y por tu sonrisa de cada mañana. Gracias por seguir con el proyecto del T1 y sacar tantos buenos resultados. Han sido muchas las vivencias compartidas contigo, tanto dentro como fuera del laboratorio. Recuerdo el primer viaje a Montpellier, junto con Juanjo y Sonia, cuando todavía casi ni nos conocíamos. Estos recuerdos son los que no se olvidan con el paso del tiempo.

Gràcies, **Sònia**, per ser tan sincera, per confiar amb el meu treball i per tenir-me tanta bona consideració. Gràcies per transmetre'm tota la teva energia i per motivar-me a treballar cada vegada més. Gràcies per ser decisiva en alguns moments, com en l'organització del viatge a Menorca, i per ser una gran amiga dels teus amics.

Juanjo, ¿qué decir de Juanjo?, una persona trabajadora, dedicada a la ciencia y con un gran potencial científico. Gracias por enseñarme a ser crítico con la ciencia y a saber sacar la parte positiva de un experimento con resultados negativos. Gracias por la alegría que transmites todo el día cantando en el laboratorio y, sobretodo, por ayudarme en mis momentos difíciles tanto científicos como personales. Por ese primer viaje a Menorca, y por tu comprensión en todo momento.

Marta, la meva companya de piata i de cursos de doctorat, gràcies per donar pau i tranquil·litat al grup, per la teva sinceritat i per la teva ajuda. Gràcies per venir-me a veure al meu DEA, tot i arribar tard, i per compartir els teus reactius amb mi. **Pancha**, gracias por interesarte por mi felicidad, por tus largas charlas en las comidas y por tus consejos. **Miguel**, gracias por la alegría que transmites y por todas tus bromas. Muchas veces son necesarias para quitarle importancia a las constantes frustraciones que te da la ciencia. Gracias por tus largas charlas sobre la vida, el futuro y la felicidad, por preguntarme en todo momento como estoy y por preocuparte por mis resultados científicos. **Raúl**, gracias por los innumerables favores que me has hecho en el laboratorio. Por nunca tener un NO por respuesta y por saber que siempre estarás allí si te necesito. Por hablar de todo tipo de temas en el metro (aunque si lo pienso bien,

creo que siempre acabo hablando yo...) y por transmitirme tu interés por la ciencia. Gràcies, **Edu**, per no deixar-me mai de costat i per estar sempre preparat per fer unes rialles o per desfogar-nos després d'una jornada llarga, o no tan llarga, de treball. Gràcies, **Cristina**, per lluitar perquè el grup progressi, per la teva alegria, per les teves històries interminables durant els dinars i per acabar entenent el meu projecte. Gracias **Alba**, por transmitir tanta felicidad, por aguantar mis bromas y por ser, ya, un RA/TGito más del grupo. **Linda**, thank you for your happiness and the possibility to improve my English. Thank you for your interest in my project and for all your information about short term fellowship and postdoc fellowship. Finalmente, acabar con las últimas incorporaciones del grupo, **Carlos** y **Daniela**. La verdad es que no ha dado tiempo a conocernos, pero lo poco que sé de vosotros es muy bueno y seguro que hubiese sido muy positivo habernos conocido antes.

Una vez nombrado a todos los miembros del grupo de Terapia Génica, quería agradecer a todos los miembros del LRT su apoyo durante mi estancia en el laboratorio. Primero de todo, me gustaría darle las gracias al director del Laboratorio de Recerca Translacional por acogerme como estudiante de prácticas, técnico y como becario predoctoral. **Gabi**, les poques vegades que he tingut el plaer de parlar amb tu, m'he adonat que tens les idees molt clares i que s'ha de ser conseqüent amb els teus actes.

Gràcies, **Àlvaro** per donar vida al laboratori, per ser la persona que animava els dinars i per ser coherent amb les teves decisions. Gràcies per treure'm a "passejar" quan ho necessitava i per compartir moltes més coses que la ciència: per acollir-me als partits d'esquaix amb el Ramon, el David i el Josep Maria, i per introduir-me en el laboratori.

Gracias, **Alberto**, por ser una persona tan luchadora, por interesarte en todo momento por mi trabajo y por saber escuchar. Por las charlas científicas y no científicas en el bus, por tus consejos sobre el doctorado y el postdoc y por tus insaciables ganas de colaborar con otros grupos.

Gràcies, **Ari**, per gaudir de la teva companyia a la poiata del davant i per sempre tenir una super rialla per mi. Gràcies, **Ester**, per ser una persona tan sincera i impulsiva, per fer les coses sense pensar en el que diran els altres. Gràcies al **Josep Maria**, al **David**, la **Laura**, la **Maria**, la **Gemma**, al **Marc**, la **Marta** y la **Laia** per ser unes persones tan agradables, per deixar-me tots els reactius que constantment els he demanat i per compartir tants anys junts en el laboratori. Gràcies a l'**Agnés** per ser un substitut del Manel quan ell no està o no et pot ajudar, per ser tan

AGRADECIMIENTOS

ordenada i per tenir arxivats tots els protocols necessaris per fer qualsevol tècnica de laboratori. Gràcies, **Natàlia**, per tenir tanta paciència amb mi i aguantar que setmana sí, setmana també, et demani de baixar al tanc de nitrogen a descongelar cèl·lules. Gracias, **Isa**, por subirme la autoestima, por animar las tardes en el laboratorio y por ser tan graciosa.

Gràcies, **Oriol**, per interessar-te pel meu treball i per la teva correcció crítica de l'últim article. Sens dubte, la teva crítica constructiva i els teus consells van ajudar a que el treball guanyés en qualitat.

Aunque esta tesis se haya realizado en el LRT1, los agradecimientos no acaban en estas cuatro paredes. Me gustaría agradecer a la gente del antiguo IRO su apoyo en este trabajo. Gracias, **Rafa**, por dejarme utilizar las rFL-MSK en este proyecto y por darme un montón de consejos sobre células madre. Aún así, no querría darle menos importancia a **Itziar**, que me ha ayudado en todo lo relacionado con las MSC y ha estado allí siempre que la he necesitado. Itziar, me parece que todavía tenemos pendiente una puesta en común de nuestros conocimientos sobre MSC y su aplicación terapéutica, ¿no? Gràcies, **Ana Aubareda**, per acollir-me a casa teva un dia difícil. Gràcies, **Lluís Espinosa**, per ajudar-me a canviar la bombona de CO₂ dels incubadors de cèl·lules en un moment crític, un dissabte per la tarde. Finalmente, gracias, **Gemma**, por dejarme compartir la primera parte de esta tesis contigo.

Gracias, ¡¡**Blanca!!**, por ser tan agradable, por todo el tiempo que hemos pasado juntos en el estabulario, por quedarte más horas de la cuenta para pinchar mis ratones, por enseñarme a inyectar los hamsters por la vena, por ser una gran compañera de equipo y, como no, por todos los “caneos” cariñosos que me has dado.

En esta Tesis Doctoral no podía dejarme de agradecer la ayuda incondicional de una gran investigadora. Gràcies, **Cristina**, no només per deixar-me tot tipus de línees cel·lulars, plàsmids, retrovirus, etc., sino també per la pluja de mails que has hagut de contestar-me durant aquests quatre anys. Sens dubte, has fet la funció de la meva segona directora de Tesi en tota la part relacionada amb els gens suicidas.

Porque no todos los agradecimientos van a ser a nivel científico, gracias a mis amigos de batalla, **Fidel**, “**Maño**”, **Francesc** y **Raúl** por todos los grandes momentos que hemos pasado juntos y por los que seguro que pasaremos en un futuro. Realmente, ¡sois los mejores!

Gracias a los amigos/as de la Pompeu, **Maya, Mar, Pilarín, Irene y Amaranant**, por los constantes reencuentros, por las cenitas de Navidad y por haber iniciado conmigo este largo camino por la ciencia.

Voldria agrair tot l'esforç i el sacrifici d'una persona molt important per mi. Gràcies, **Esther**, per aguantar-me durant l'escriptura d'aquesta Tesi i no enfadar-te quan estava tot un diumenge escrivint sense dir-te res; per ajudar-me en tot el que he necessitat, per mostrar tan interès per la ciència però, sobretot, GRÀCIES per fer tan fàcil i agradable la convivència, per estimar-me i per formar part de la meva vida.

Finalmente, agradecer a mi familia todo el apoyo recibido. En primer lugar, a mi tío **Alejandro**, por ser un enamorado de la ciencia y por motivarme constantemente a que siga investigando. Y, por último, a mis padres, **Juan y Carmen**, que sin su apoyo esta tesis no hubiera sido posible. Gracias por transmitirme todos los valores de la vida, por enseñarme a luchar por lo que quiero, a no rendirme nunca y a valorar las cosas pequeñas que te da la vida. Gracias por vuestra humildad, vuestros buenos consejos y vuestra comprensión en los momentos difíciles. Gracias por vuestro tiempo y por todas las veces que me habéis preguntado cómo iba la tesis, por saber escuchar y, en definitiva, por ser como sois.

Esta tesis se ha realizado en el grupo de Terapia Génica y Viral del Laboratori de Recerca Translacional (LRT) englobado en l'Institut d'Investigació Biomèdica de Bellvitge (IDIBELL), bajo la dirección del **Dr. Ramon Alemany Bonastre**.

La memoria ha sido escrita en formato de artículos científicos publicados y se estructura, según se especifica en el índice, en los siguientes apartados: Introducción, Objetivos, Resultados (en forma de dos artículos científicos publicados como primer autor), Discusión general, Conclusiones, Bibliografía y Anexos (donde se especifican los Materiales y Métodos y los Resultados de toda la parte que no aparece en los dos artículos, y se hace referencia a los artículos de colaboración).

El adenocarcinoma de páncreas y el cáncer de colon son una de las causas de muerte, relacionadas con el cáncer, más comunes en los países desarrollados. Los tratamientos convencionales para este tipo de tumores son poco efectivos y es necesario el desarrollo de nuevas terapias. Entre las terapias experimentales destaca la terapia con genes suicidas que consiste en la eliminación selectiva de las células tumorales que han sido modificadas con un gen suicida. A pesar de los resultados esperanzadores obtenidos en la preclínica, el efecto terapéutico de los ensayos clínicos ha sido muy reducido. Existen dos limitaciones principales que explicarían estos resultados. En primer lugar, la baja eficiencia de transducción de los vectores transportadores de genes suicidas utilizados en la clínica, y en segundo lugar, la necesidad de administrar localmente dichos vectores por un tema de seguridad.

Con tal de aumentar el número de células transducidas con genes suicidas en el tumor, en esta tesis doctoral, proponemos una estrategia terapéutica novedosa basada en el enriquecimiento de dichas células.

La modificación de las células tumorales con un gen de resistencia a drogas y un gen suicida permitiría enriquecer la población modificada en el tumor mediante tratamiento con una droga de selección. Después de esta selección positiva, la aplicación de la prodroga adecuada aumentaría la eficiencia de la terapia génica suicida *per se*.

En esta tesis doctoral, la prueba de concepto de esta terapia se ha realizado en un modelo colorrectal modificado con el marcador de selección DHFR y el gen suicida TK y en un modelo de adenocarcinoma pancreático modificado con el gen de resistencia a multidrogas MDR1 y el gen suicida TK. Ambas aproximaciones han demostrado que el enriquecimiento de las células modificadas con genes suicidas en el tumor puede solucionar la limitación de los bajos niveles de transducción tumoral, mejorando así, la eficacia de terapia génica suicida.

Por otro lado, nos planteamos si las células madre mesenquimales (MSC) adultas o fetales, utilizadas para dirigir genes suicidas de forma sistémica hacia el tumor, podrían seleccionarse positiva y negativamente después del tratamiento con una droga de selección. A pesar de

PRESENTACIÓN

obtener un enriquecimiento de estas células en cocultivos con células tumorales NP18 mediante tratamiento con docetaxel, no se observó una selección positiva de éstas en tumores mixtos tratados con la droga de selección.

Este trabajo ha sido financiado por el Ministerio de Educación y Ciencia BIO2005-08682-C03 y por una beca predoctoral del 2006-2009 de la Función Privada Institut d'Investigació Biomèdica de Bellvitge (IDIBELL).

ABREVIATURAS Y ACRÓNIMOS

AAV: Virus adenoasociados

ABC: del inglés, *Adenosine triphosphate (ATP)-Binding Cassette*

ADC: del inglés, *adipose-derived stem cells*

ADN: ácido desoxirribonucleico

ADNc: ácido desoxirribonucleico complementario

ARN: ácido ribonucleico

ARNm: ácido ribonucleico mensajero

ATCC: del inglés, *American Type Cell Culture*

ATP: Adenosina trifosfato

BCNU: carmustina

BCRP: del inglés, *Breast Cancer Resistance Protein*

CD: Citosina Deaminasa

CMV: cytomegalovirus

CYP2B1: Citocromo P450 isoforma 2B1

DAPI: 4',6-diamidino-2-fenilindol

DHFR: dihidrofolato reductasa

DMEM: del inglés, *Dulbecco's Modified Eagle's Medium*

DMSO: dimetil sulfóxido

Dr: doctor

ESC: del inglés, *Embryonic Stem Cell*

FBS: del inglés, *Fetal Bovine Serum*

5-FC: 5-fluorocitosina

FCU: gen de fusión formado por la CD y la UPRT

5-FU: 5-fluorouracilo

g, mg, ng, µg: gramos, miligramos, nanogramos, microgramos

Gb3: Globotriaosilceramidas

GCV: Ganciclovir

GFP: del inglés, *Green Fluorescent Protein*

h: horas

hASC: del inglés, *Human Adiposo Stem Cells*

HBSS: del inglés, *Hepes Buffered Saline Solution*

hMSC: del inglés, *Human Mesenchymal Stem Cells*

HOXB4: del inglés, *Homeobox B4*

HSC: del inglés, *Hematopoietic Stem Cell*

HSV: del inglés, *Herpes Simplex Virus*

IC₅₀: del inglés, *Inhibitory Concentration 50*

IL: interleuquina

IMEM: del inglés, *Iscove's Modification Dulbecco's Medium*

IRES: del inglés, *Internal Ribosomal Entry Sites*

kb: kilobases

l, ml, µl: litros, mililitros, microlitros

IL : interleuquinas

LB: medio Luria Bertani

LRP: del inglés, *Lung Resistance Gene*

M: molar

mm: milímetros

MDR: del inglés, *Multidrug Resistance Gene*

MGMT: del inglés, *Methyl-Guanine Methyl Transferase*

mMSC: del inglés, *Mouse Mesenchymal Stem cell*

MR: del inglés, *Magnetic Resonance*

MRP: del inglés, *Multidrug Resistance Proteína*

MTT: bromuro de 3-(4,5-dimetietiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolium

MTX: metotrexato

MSC: del inglés, *Mesenchymal Stem Cell*

NTR: nitroreductasa

PALA: del inglés, *N-(phosphonacetyl)-L-aspartate*

pb: pares de bases

PBS: del inglés, *Phosphate Buffer Saline*

PEG : Polietilenglicol

PET : del inglés, *Positron Emission Tomography*

PFA: paraformaldehido

Pgp: del inglés, *P-glycoprotein*

P/S: del inglés, Penicilin/Streptomycin

PSA: del inglés, *Prostate Specific Antigen*

rFL-MSC: : del inglés, *rabbit Fetal Liver Mesenchymal Stem Cell*

RFP: del inglés, *Red Fluorescent Protein*

RGD: Arginina-Glicina-Ácido Aspártico

SB: del inglés, *Sleeping Beauty*

SCID: del inglés, *Severe Combined Immunodeficiency*

S/MAR: del inglés, *Scaffold/Matrix Attachment Region*

SV40: del inglés, *Simian Virus 40*

TAF: del inglés, *Tumor Associated Fibroblasts*

TK: Timidina Quinasa

TMTX: trimetrexato

TMZ: temozolomida

TS: Timidilato Sintasa

UPRT: del inglés, *Uracil Phosphoribosyltransferase*

VSV-G: del inglés, *Vesicular Stomatitis Virus G glycoprotein*

VT: Verotoxina

ÍNDICE

PRESENTACIÓN	I
AGRADECIMIENTOS	VII
ABREVIATURAS Y ACRÓNIMOS	IX
ÍNDICE	XV
 INTRODUCCIÓN	
 1. EL CÁNCER	 3
1.1. Definición e incidencia	3
1.2. Características de las células tumorales	3
 2. LA QUIMIOTERAPIA CONTRA EL CÁNCER	 4
2.1. Tipos de quimioterapia	4
2.2. Resistencia a la quimioterapia	6
2.2.1. Genes de resistencia	7
2.2.1.1. Gen de resistencia a drogas (MDR1)	7
2.2.1.2. La dihidrofolato reductasa (DHFR)	10
2.2.1.3. Otras proteínas de resistencia a drogas (MRP, LRP y BCRP)	10
2.2.2. Inhibidores de las proteínas de resistencia	11
 3. LA TERAPIA GÉNICA CONTRA EL CÁNCER	 12
3.1. Vectores de transferencia génica estable	12
3.1.1. Vectores virales	12
3.1.1.1. Vectores retrovirales	12
3.1.1.2. Vectores lentivirales	14
3.1.1.3. Vectores adenoasociados	14
3.1.2. Vectores no virales	15
3.1.2.1. Sistemas basados en partículas	15
3.1.2.2. Sistemas basados en plásmidos episomales	16
3.1.2.3. Sistemas basados en transposones	17
3.2. Terapia con genes suicidas	18
3.2.1. El sistema Timidina Quinasa/Ganciclovir (TK/GCV)	20
3.2.1.1. Fundamento y mecanismo de acción	22
3.2.1.2. Aumento de la eficacia	23

3.2.2. El sistema Citosina Deaminasa/ 5-fluorocitosina (CD/5-FC)	24
3.2.3. El sistema CD-uracil fosforibosil transferasa fusionado/5-FC (FCU/5-FC)	24
3.2.4. El sistema Nitroreductasa/CB1954 (NTR/CB1954)	25
3.2.5. El Citocromo P450 2B1/fosfamida (CYP2B1/IFO o CPA)	25
3.3. Experiencia clínica de la terapia con genes suicidas	26
3.4. Limitaciones de la terapia génica suicida	27
4. MECANISMOS PARA ENRIQUECER UNA POBLACIÓN CELULAR	30
4.1. La competencia celular	30
4.1.1. Competencia entre células normales y células con una desventaja proliferativa	30
4.1.2. Competencia entre células con una ventaja proliferativa y células normales	32
4.1.3. Competencia entre células tumorales	33
4.1.4. Competencia entre células tumorales y células madre	33
4.2. Los genes de selección	34
4.2.1. La quimioprotección	35
4.2.2. Selección positiva de células modificadas con genes suicidas	36
5. LAS CÉLULAS MADRE	38
5.1. Células Madre Mesenquimales (MSC)	39
5.1.1. Descubrimiento	39
5.1.2. Caracterización	40
5.1.3. MSC de tejido adiposo (ADC)	40
5.1.4. MSC fetales	41
5.1.5. Utilización terapéutica de las MSC	42
5.1.5.1. Propiedades inmunomoduladores y su aplicación terapéutica	42
5.1.5.2. Propiedades reparadoras y su aplicación terapéutica	42
5.1.5.3. Tropismo hacia las zonas de inflamación y su aplicación terapéutica	43
5.1.6. Estrategia de selección positiva-negativa con MSC	44
OBJETIVOS	47
RESULTADOS	51
RESUMEN ARTÍCULO 1: “Antitumor therapy based on cellular competition”	55
ARTÍCULO 1	59
RESUMEN ARTÍCULO 2: “Positive selection of gene-modified cells increases the efficacy	

of pancreatic cancer suicide gene therapy”	71
ARTÍCULO 2	75
Otros resultados	87
DISCUSIÓN GENERAL	89
CONCLUSIONES	121
BIBLIOGRAFÍA	125
ANEXO I: MATERIALES Y MÉTODOS	149
ANEXO II: RESULTADOS	169
ANEXO III: PUBLICACIONES RELACIONADAS	179

INTRODUCCIÓN

1. EL CÁNCER

1.1. Definición e incidencia

El cáncer es una patología celular caracterizada por el crecimiento excesivo e incontrolado de una célula, o de un grupo de células. La división desmesurada de esta célula se debe a la adquisición de una serie de cambios en su material genético que le aportan una ventaja proliferativa respecto a las células normales.

El cáncer constituye la segunda causa de mortalidad en los países desarrollados, siendo el responsable del 26.2% de las muertes totales (**Tabla 1**). A pesar de los esfuerzos y la gran cantidad de recursos económicos destinados a mejorar su tratamiento, el cáncer causa más de 2 millones de muertes al año en los países desarrollados (**Tabla 1**).

Principales causas de mortalidad en los países desarrollados

Ránquing	Causa de muerte	Número de muertes*	% total de muertes
1.	Enfermedades cardiovasculares	2,258	28.6
2.	Cáncer	2,066	26.2
3.	Enfermedades cerebrovasculares	781	9.9
4.	Infecciones respiratorias	345	4.4
5.	Enfermedad respiratoria obstructiva crónica	297	3.8
6.	Diabetes mielitus	202	2.6
7.	Suicidios	126	1.6
8.	Accidentes de tráfico	121	1.5
9.	Cirrosis	118	1.5
10.	Otras	1577	20

Tabla 1. Principales causas de mortalidad en los países desarrollados. Estos datos han sido extraídos a partir del informe de la Sociedad Americana contra el Cáncer publicado en el 2007. * Número de muertes expresado en miles.

1.2. Características de las células tumorales

Las células tumorales se caracterizan principalmente por tener una ventaja proliferativa respecto a las células normales. La célula tumoral en división está sometida a cambios genéticos constantes debido a su inestabilidad genética y a su deficiencia en la capacidad de reparación del daño en el ADN. Esto le permite la adquisición de las mutaciones necesarias para su evolución como célula tumoral. Estas mutaciones tienen lugar en tres tipos de genes celulares: los protooncogenes o activadores del ciclo celular, los genes supresores de tumores o inhibidores del ciclo celular y los genes de reparación del ADN.

2. LA QUIMIOTERAPIA CONTRA EL CÁNCER

El principal objetivo de las terapias contra el cáncer es la eliminación de todas las células tumorales sin dañar el resto de tejidos. El tratamiento de los tumores localizados se basa en la extracción total del tumor antes de que se produzca la metástasis. La radioterapia también es utilizada frecuentemente en la práctica clínica para el tratamiento de los tumores no metastáticos.

Una vez generadas las metástasis, la principal causa de muerte de los pacientes con neoplasias, la quimioterapia pasa a ser la primera línea de tratamiento.

2.1. Tipos de quimioterapia

La quimioterapia se basa en la utilización de agentes químicos citotóxicos o citostáticos para destruir las células tumorales. Estos agentes afectan la maquinaria de replicación de las células en división y su selectividad se basa en la capacidad de las células normales en división de reparar el daño generado en su ADN. Existen varias familias de quimioterápicos, las más conocidas son:

- **Los agentes alquilantes** son drogas no específicas de ciclo celular que produce uniones cruzadas en el ADN de la célula. Se utilizan para tratar la enfermedad de Hodgkin, linfomas, leucemias crónicas y algunos carcinomas de pulmón, mama, próstata y ovario. Dentro de esta categoría encontramos la ciclofosfamida, mecloretamina, el cisplatino y los derivados del gas mostaza.
- **Los antimetabolitos** son compuestos muy similares a los metabolitos endógenos de la célula e interfieren en la biosíntesis de los ácidos nucleicos. Se utilizan principalmente para tratar tumores de la vía digestiva, mamarios, ováricos y linfomas. Dentro de esta categoría encontramos el metotrexato, el 5-fluorouracilo (5-FU) y la gemcitabina.

El metotrexato (MTX) es un antagonista del ácido fólico que entra a la célula mediante un sistema de transporte específico y, una vez dentro, inhibe específicamente la dihidrofolato reductasa (DHFR). Esta interacción bloquea la síntesis de purinas y timidilatos, inhibiendo así la replicación del ADN y causando la muerte de la célula. En la clínica, el MTX sólo o en combinación con otros compuestos está indicado para el tratamiento de varios tipos de tumores, pero no se utiliza en tumores colorectales ni en pancreáticos (**Tabla 2**). En una gran proporción de los pacientes, el tratamiento con MTX se ha asociado con mielosupresión o con toxicidad gastrointestinal. En ensayos clínicos, la eficacia del MTX se ha visto disminuida debido a la aparición de resistencias asociadas a una amplificación del gen DHFR, una reducción del transporte de MTX o alteraciones

intracelulares de la droga. En esta tesis, el MTX se ha utilizado para enriquecer las células tumorales modificadas con el gen de resistencia DHFR y un gen suicida en el modelo de cáncer colorrectal humano HCT116.

- **Los antibióticos antitumorales** o citostáticos. Estos compuestos derivan de productos naturales y forman complejos estables con el ADN, inhibiendo su síntesis. Se utilizan para tratar gran variedad de tumores entre los que destacan los testiculares y las leucemias. Dentro de este grupo encontramos la doxorubicina y la mitomicina-C.
- **Los alcaloides.** Son compuestos de origen vegetal que interfieren en el ciclo celular. Dentro de este grupo encontramos los agentes antimicrotubulares que disminuyen la cantidad de tubulina libre, bloqueando así, la mitosis. En este grupo encontramos los vincalcaloides (vincristina y vinblastina) y los taxanos (paclitaxel y docetaxel).

El docetaxel (Taxotere) es un compuesto semisintético que proviene del árbol del tejo (*Taxus baccata*). Su efecto antitumoral está mediado por una inhibición de la degradación de microtúbulos, lo que produce un marcado descenso de la tubulina libre y, como consecuencia, una parada del ciclo celular. Este compuesto quimioterapéutico está indicado para el tratamiento de varios tipos de tumores, pero no se utiliza ni en cáncer colorrectal ni en cáncer de páncreas (**Tabla 2**). En numerosos ensayos clínicos se ha observado resistencias al tratamiento debido a una sobreexpresión innata o adquirida del gen de resistencia a drogas (MDR1). En el presente trabajo se ha utilizado el docetaxel para enriquecer las células modificadas con el gen de resistencia MDR1 y un gen suicida en el modelo de adenocarcinoma pancreático humano NP18.

Tipo de quimioterapia	Tipos de tumores tratados	Tipos de tumores no tratados
MTX	Leucemia linfocítica aguda Osteosarcoma Sarcoma de Ewing Linfoma no Hodkin Coriocarcinoma Cáncer de mama Cáncer de pulmón Cáncer de cabeza y cuello Cáncer de estómago	Cáncer de colon Cáncer de páncreas
Docetaxel	Cáncer de mama Cáncer de pulmón de célula no pequeña Cáncer de próstata Adenocarcinoma gástrico Cáncer de cabeza y cuello	Cáncer de colon Cáncer de páncreas

Tabla 2. Tumores en los que el MTX y el docetaxel son utilizados como primera línea de tratamiento y tumores en los que no. Los compuestos quimioterapéuticos MTX y docetaxel están indicados para el tratamiento de un tipo de tumores, pero no se utilizan ni en el cáncer de colon ni en el cáncer pancreático.

Para combatir esta frecuente adquisición de resistencias por las células tumorales, frecuentemente, se utilizan diversos agentes quimioterapéuticos a la vez, interfiriendo así en diferentes vías del ciclo celular y del metabolismo de la célula tumoral. Además, el uso de cócteles de quimioterapias permite administrar dosis más bajas de cada una de ellas, aumentando así la eficacia antitumoral y reduciendo la toxicidad.

2.2. Resistencia a la quimioterapia

Una de las principales causas de la falta de eficacia de los tratamientos quimioterapéuticos contra el cáncer es la frecuente aparición de resistencias. Se ha de tener presente que un tumor no está formado por células genéticamente idénticas, ya que gracias a su inestabilidad genética las células tumorales en división adquieren cambios genéticos constantemente. Esto significa que las células tumorales que componen un tumor son similares, pero no idénticas. Cuando se trata un tumor con quimioterapia, aquellas células que son sensibles al tratamiento son eliminadas. En cambio, las células que han adquirido una diferencia (mutación o sobreexpresión de un gen) que les aporta una resistencia al tratamiento poseen una ventaja selectiva frente a las células tumorales sensibles y continúan dividiéndose. El resultado final de este proceso es un enriquecimiento de las células resistentes dentro del tumor y la generación de un tumor refractario a la quimioterapia original (**Figura 1**).

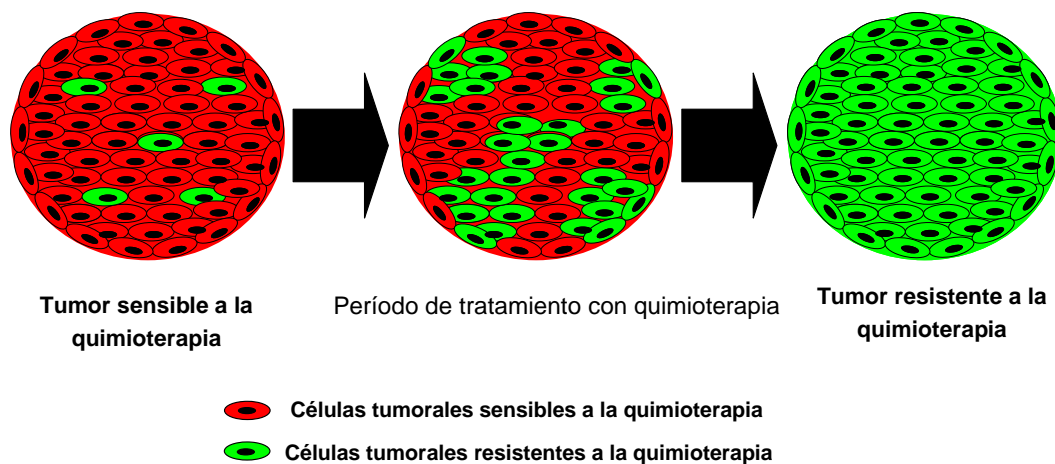


Figura 1. Proceso natural de resistencia a la quimioterapia. Cuando un paciente con neoplasia se trata con quimioterapia la mayoría de las células sensibles del tumor (marcadas en rojo) mueren por efecto del tratamiento. Durante este proceso, la presión selectiva generada por esta quimioterapia induce un enriquecimiento de las células tumorales resistentes de forma innata o adquirida (marcadas en verde). Al final del tratamiento acaba recreciendo un tumor formado únicamente por células tumorales quimioresistente que acaba provocando la muerte del paciente. Adaptada de Martínez-Quintanilla et al Human Gene Therapy 2009.

Algunos tipos de tumores, como el cáncer de pulmón o el de recto, muestran una resistencia innata, que es aquella que presenta un tumor sin contacto previo con el agente

quimioterapéutico. Por otro lado, muchos tipos de tumores sensibles, como el cáncer de mama o el cáncer de ovario, inicialmente responden bien a la quimioterapia, pero tras el contacto con el agente desarrollan resistencias, lo que se denomina resistencia adquirida.¹ Las características que determinan la resistencia a la quimioterapia son la cinética de crecimiento y la aparición de mutaciones espontáneas.²

2.2.1. Genes de resistencia

El principal mecanismo de adquisición de resistencia por parte de las células tumorales es la amplificación o sobreexpresión de genes que codifican proteínas transportadoras de membrana encargadas del flujo de compuestos tóxicos. Este incremento del transporte de compuestos resulta en una disminución de la concentración intracelular de los compuestos quimioterapéuticos.³ Entre estos genes, encontramos el gen de resistencia a drogas (MDR), las proteínas asociadas a resistencia a drogas (MRP), la proteína de resistencia a cáncer de pulmón (LRP) y la proteína de resistencia a cáncer de mama (BCRP).

Otro mecanismo de resistencia es la sobreexpresión de los propios genes diana de los compuestos quimioterapéuticos, lo que repercute en una baja eficacia de estos tratamientos. Entre estos genes, encontramos la dihidrofolato reductasa (DHFR) o la Timidilato Sintasa (TS), cuya sobreexpresión inhibe el efecto del MTX y del 5-FU, respectivamente.

En esta tesis se ha utilizado el gen MDR1 y el gen DHFR para conferir una ventaja selectiva en presencia de docetaxel o MTX, respectivamente, a las células transducidas con genes suicidas.

2.2.1.1. Gen de resistencia a drogas (MDR1)

A pesar de los logros alcanzados en la quimioterapia antitumoral, la resistencia a los agentes citotóxicos constituye un gran obstáculo para la curación de los pacientes. Se han identificado varios genes y vías metabólicas implicadas en este fenómeno, pero, hasta el momento, el gen MDR1 ha sido el más estudiado por su gran implicación clínica en el proceso de resistencia a quimioterapia. Este gen codifica para la glicoproteína P (Pgp) de 170 aminoácidos que pertenece a la superfamilia de proteínas ABC (casete de unión a la adenosina trifosfato), especializadas en el transporte celular dependiente de energía, que participan en un amplio rango de eventos como la expulsión de sustancias nocivas, secreción de toxinas y movilización de iones y péptidos.

La Pgp es una bomba extractora que se expresa en varios tejidos humanos asociados con funciones secretoras o de barrera. Constituye un sistema de detoxificación natural al reconocer y expulsar de la célula una gran variedad de sustratos (**Figura 2**). A pesar de su función natural, la Pgp también expulsa una gran variedad de compuestos antitumorales (**Tabla 3**).⁴

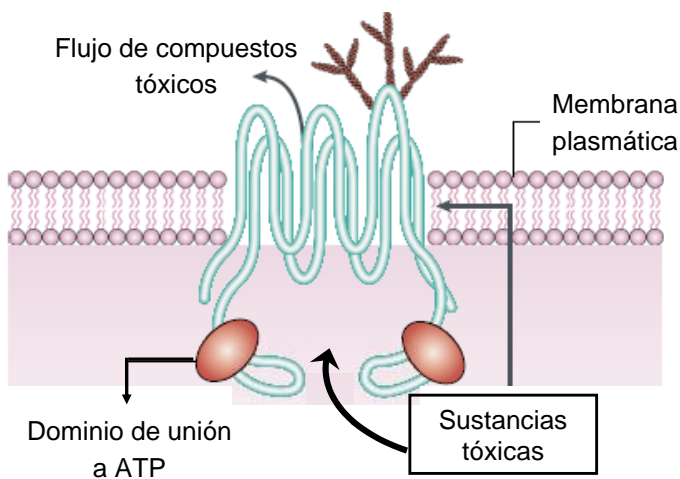


Figura 2. Mecanismo de acción de la glicoproteína P (P-gp). En esta imagen se muestra la función de la P-gp en una célula normal. Esta bomba de flujo se encuentra en la membrana plasmática de las células, se activa mediante la hidrólisis de una molécula de ATP e induce la salida de las moléculas tóxicas fuera de la célula. Adaptado de Sorrentino et al. Nature Review 2002.

Gen de resistencia	Producto génico	Sustrato	Inhibidor	No sustrato
MDR1	pGP	Docetaxel Paclitaxel Vincristina Vinblastina Doxorrubicina Etopósido Topotecan Mitomicina C Irinotecan	Verapamilo Dexverapamilo Nifedipina Quinidina Trifluoperazinas Tamoxifeno Progesterona Cefoperazone Ciclosporina A Valspodar Tariquidar	Cisplatino Carboplatino MTX 5-FU Gemcitabina Ciclofosfamida Carmustina Bleomicina

Tabla 3. Principales sustratos e inhibidores de la Pgp. En la última columna se enumeran los compuestos quimioterapéuticos que no interaccionan con la Pgp y que pueden ser utilizados para el tratamiento de tumores que sobreexpresan el gen MDR1.

Se conoce que los tejidos con funciones secretoras o de barrera como el colon, riñón o páncreas tienen una alta expresión del gen MDR1. Por lo tanto, los tumores originados en estos órganos, pueden presentar resistencia innata a la quimioterapia debida a esta sobreexpresión (Tabla 4).⁵

Expresión del gen MDR1 en tumores humanos antes de ser tratados con quimioterapia

Alta expresión del gen MDR1	Ocasionalmente alta expresión del gen MDR1	Expresión baja o ausente del gen MDR1
Cáncer de colon	Neuroblastoma	Cáncer de mama
Adenocarcinoma renal	Leucemia linfoblástica	Cáncer de pulmón
Carcinoma pancreático	Leucemia mieloblástica	Melanoma
Carcinoma pulmonar de células pequeñas neurosecretor	Linfomas no hodgkinianos	Cáncer de próstata
Hepatoma	Leucemia linfoide crónica	Carcinoma ovárico
	Astrocitoma	Cáncer de cabeza y cuello
	Mieloma múltiple	Cáncer de esófago
		Carcinoma gástrico
		Leucemia mieloide crónica
		Carcinoma vesical
		Mesotelioma
		Sarcomas
		Timoma
		Carcinoma tiroideo
		Tumor de Wilms

Tabla 4. Expresión del gen MDR1 en tumores humanos antes del tratamiento con quimioterapia. De Fernández et al. Revista Cubana de Oncología 1998.

Entre los tumores que tienen una expresión del gen MDR1 baja o ausente antes del tratamiento con quimioterapia, se encuentran algunos tumores sensibles a la quimioterapia como el tumor de Wilms, otros tumores que adquieren resistencia a quimioterapia por sobreexpresión del gen MDR1 después del tratamiento, como el cáncer de mama, el carcinoma ovárico o la leucemia mieloide crónica (**Tabla 5**), y otros tumores como el melanoma, que a pesar de no observarse una sobreexpresión de la Pgp después del tratamiento, adquiere resistencia a diversos tipos de quimioterapia por otros mecanismos. Algunos grupos han postulado que la sobreexpresión de la Pgp inducida por el tratamiento con quimioterapia podría ser utilizada como un factor pronóstico, pero los resultados obtenidos de estos estudios han generado cierta controversia.⁶⁻⁸

Tipos de tumores con alta expresión del gen MDR1 después del tratamiento con quimioterapia

Linfomas no hodgkinianos
 Leucemia linfoblástica
 Mieloma múltiple
 Leucemia linfoide
 Neuroblastoma
Cáncer de mama
Carcinoma ovárico
Leucemia mieloide crónica

Tabla 5. Tipos de tumores que sobreexpresan el gen MDR1 después del tratamiento con quimioterapia. Ciertos tumores, como el cáncer de mama, el carcinoma ovárico y la leucemia mieloide crónica (marcados en negrita) muestran una expresión baja o ausente del gen MDR1 antes de administrar la quimioterapia (**Tabla 4**) y una sobreexpresión del mismo después del tratamiento. Estos tumores tienen especial relevancia ya que a pesar de responder inicialmente al tratamiento con quimioterapia adquieren resistencia y recrecen de forma más agresiva induciendo, en muchos casos, la muerte del paciente. De Fernández et al. Revista Cubana de Oncología 1998.

A pesar de su frecuente adquisición de resistencias debido a la sobreexpresión del gen MDR1, los taxanos son quimioterapias de primera línea en el tratamiento del cáncer de mama metastático⁹ y del carcinoma de ovario avanzado¹⁰.

2.2.1.2. La dihidrofolato reductasa (DHFR)

La DHFR es una enzima celular que regenera el tetrafolato necesario para la síntesis de nucleótidos. La DHFR puede ser inhibida por el agente quimioterapéutico MTX, bloqueando así, la síntesis de purinas, timidilatos y ciertos aminoácidos. En los años 80, se descubrió que la amplificación del gen DHFR, la propia diana del MTX, y la consecuente sobreexpresión de la enzima, es el principal mecanismo de adquisición de resistencia a esta quimioterapia.¹¹ El fenómeno de amplificación del gen DHFR también se ha observado en pacientes con tumores después del tratamiento con MTX.¹² Se han descrito mutaciones que disminuyen la afinidad de unión del DHFR al MTX y que están implicadas en fenómenos de resistencia.^{13, 14} El gen de la DHFR con la doble mutación Phe22-Ser31 ha sido utilizado como gen de selección para amplificar la población diana en estudios de transferencia génica.¹⁵

2.2.1.3. Otras proteínas de resistencia a drogas (MRP, LRP y BCRP)

Las proteínas asociadas a resistencia a drogas (MRP), son una familia de transportadores celulares que se localizan en la membrana plasmática, formando parte de los transportadores ABC, y en el retículo endoplasmático. Esto indica que pueden actuar tanto en la expulsión de drogas fuera de la célula como en el secuestro intracelular de éstas en vesículas citoplasmáticas.^{16, 17} Debido a su capacidad para transportar moléculas cargadas negativamente, la sobreexpresión de estas proteínas se ha relacionado con resistencia a MTX¹⁷ y a cisplatino^{18, 19}. También se ha detectado resistencia a irinotecán, mitoxantrona, antraciclinas, alcaloides de la vinca y doxorrubicina.²⁰ Mientras su eficiencia para transportar este tipo de compuestos es mayor que la Pgp, su afinidad para los taxanos es mucho menor²⁰.

La proteína de resistencia a cáncer de pulmón (LRP) parece estar implicada en la regulación del transporte de fármacos entre núcleo y citoplasma, y entre éste y el interior de las vesículas citoplasmáticas.²¹ La transferencia del gen LRP por sí sola no es suficiente para conferir resistencia a drogas. Aún así, *in vitro* se ha demostrado su implicación en la resistencia a adriamicina, vincristina y taxol.

La proteína de resistencia a cáncer de mama (BCRP) funciona como un transportador ABC y su expresión confiere una elevada resistencia a las antraciclinas y a los inhibidores de la topoisomerasa I (topotecan), pero no parece afectar a los taxanos, alcaloides de la vinca ni al cisplatino.^{16, 22}

2.2.2. Inhibidores de las proteínas de resistencia

La aparición de resistencias a la quimioterapia es un fenómeno frecuente en los pacientes con cáncer y repercute en la eficacia de los tratamientos quimioterapéuticos convencionales. Esta limitación ha llevado a la búsqueda de estrategias para evitar estas resistencias.^{23, 24} Debido a su gran repercusión clínica, la mayoría de esfuerzos se han destinado a la búsqueda de mecanismos para inhibir la resistencia mediada por la Pgp.

La forma más simple de combatir el mecanismo de resistencia de la Pgp es la utilización de antineoplásicos que no sean sustratos de esta proteína (**Tabla 3**). A pesar de ello, muchos de estos compuestos sólo son eficaces en algunos tipos de tumores.

La otra opción para combatir el fenómeno de resistencia mediado por la Pgp es la utilización de moduladores específicos de esta proteína (**Tabla 3**). Entre los inhibidores de la primera generación destacan:

- Bloqueantes de los canales de calcio como el verapamilo o la nifedipina
- Inmunosupresores como la ciclosporina A²⁵

El verapamilo es el inhibidor de la pGP más utilizado en la clínica. A pesar de ello, la dosis necesaria para conseguir un efecto terapéutico es cardiopélica en pacientes. Para disminuir esta toxicidad se generaron una segunda generación de moduladores de la P-gp, entre los que encontramos el dexverapamilo (derivado del verapamilo) y el valsopodar (derivado de la ciclosporina D). Estos compuestos tienen una actividad inhibitoria superior a sus predecesores²⁶, menos efectos tóxicos y han sido probados en la clínica²⁷. A pesar de estas mejoras, estos compuestos igual que sus predecesores, interaccionan inespecíficamente con enzimas celulares como el citocromo P450, lo que produce cierta toxicidad.⁴ Para solucionar esta limitación, se ha diseñado una tercera generación de inhibidores con más afinidad y selectividad por la Pgp. Estos compuestos, a diferencia de los anteriores, no compiten con el sustrato de la Pgp, sino que inhiben específicamente la actividad ATPasa de la Pgp.²⁸ Uno de los compuestos más prometedores de este grupo es el tariquidar (XR9576) que, recientemente, ha mostrado resultados esperanzadores en la clínica.²⁹

3. LA TERAPIA GÉNICA CONTRA EL CÁNCER

La definición clásica de terapia génica es el uso de material genético como agente terapéutico. En las últimas décadas, esta terapia ha sido optimizada gracias a los avances en la biología molecular del tumor y a la mejora de los vectores virales y no virales utilizados para la transferencia del ADN. Esta transferencia puede ser *ex vivo*, cuando las células que se quieren modificar se manipulan fuera del paciente, o *in vivo*, cuando la modificación genética se realiza directamente, sin necesidad de extraer las células diana del organismo.

3.1. Vectores de transferencia génica estable

La terapia génica se basa en la utilización de vehículos, comúnmente llamados vectores, que permiten la transferencia de genes exógenos a las células diana. En las últimas décadas se han desarrollado diversos tipos de vectores de transferencia que han sido clasificados en dos grandes categorías: vectores virales y vectores no virales. Nuestra finalidad es utilizar los vectores de transferencia para obtener una expresión estable de los genes de interés en las células diana. Por este motivo, en el siguiente apartado nos centraremos básicamente en los vectores que permiten una transferencia génica estable.

3.1.1. Vectores virales

Una característica común de todos los virus es el transporte de sus propios genes de una célula a otra. Por este motivo, los virus han sido de gran utilidad en los procesos de transferencia de genes terapéuticos. El avance en la virología ha permitido el diseño de virus modificados para su uso como vectores de transferencia. Esta estrategia consiste en la sustitución de los genes virales necesarios para la replicación del virus por el gen terapéutico, manteniendo su capacidad infectiva y eliminando su capacidad replicativa. Debido a su incapacidad de replicación, estos vectores virales han de ser producidos en líneas celulares empaquetadoras que complementan las proteínas necesarias para su replicación. Los vectores virales que permiten una transferencia génica estable son aquellos que derivan de los retrovirus, lentivirus y adenoasociados. Cada uno de ellos presenta ventajas e inconvenientes, detalladas en la **Tabla 6**.

3.1.1.1. Vectores retrovirales

Los retrovirus son virus de ARN de doble cadena que tienen la capacidad de integrar su material genético dentro del genoma de la célula infectada. El genoma del retrovirus se divide en dos regiones:

- **Secuencias control:** Situadas en los extremos del genoma retroviral y necesarias para las etapas tempranas del ciclo viral, tales como, la iniciación de la transcripción inversa del ARN viral, la integración del ADNc resultante, la replicación viral y la encapsidación del ARN viral.
- **Genes estructurales** (*gag*, *pol* y *env*): Situados en la zona central del genoma retroviral y encargados de codificar los componentes estructurales de la progenie viral.

Esta disposición modular facilita la obtención de vectores en los que se sustituye los genes estructurales por el gen terapéutico. Debido a la ausencia de los genes estructurales, el ciclo infectivo no puede llevarse a cabo. Esta restricción impide la formación de nuevas partículas infectivas, evitando así, la diseminación de retrovirus recombinantes. Estos vectores se utilizan en patologías donde se necesita una expresión prolongada del gen terapéutico. Su inconveniente es la activación de protooncogenes o la represión de genes supresores de tumores debido a la mutagénesis insercional.³⁰

La producción de los vectores retrovirales se basa en la construcción de un vector retroviral genómico (VRG) que consiste en la clonación del ADN del vector retroviral en un plásmido bacteriano. La producción se realiza mediante la transfección del VRG en líneas celulares que complementan en *trans* las proteínas producidas por los genes estructurales *gag*, *pol* y *env*. Existen dos estrategias a seguir:

1) Producción estable de retrovirus recombinante a partir de la línea celular empaquetadora PA317 que expresan de forma constitutiva las proteínas *gag*, *pol* y *env*. De forma simplificada, esta línea celular se generó a partir de la transfección estable en NIH3T3 de un genoma retroviral al que se le había deleccionado todos los genes requeridos para la replicación viral.³¹

2) Producción transitoria de retrovirus recombinante utilizando la línea 293 Phoenix. Esta línea se generó mediante la doble transfección estable en 293T (línea celular humana de riñón embrionario transformada con el gen E1a del adenovirus y el antígeno T del virus del simio 40)³² de un plásmido que expresaba los genes *gag-pol* con el marcador de selección a higromicina y de otro que expresa el gen *env* con el marcador de selección de la toxina diftérica. Existen varios tipos de 293 Phoenix (ecotróficas o anfotróficas), según el gen de la proteína *env* que expresan. Así pues, según el tipo de 293 Phoenix utilizado, la envuelta del virus originado variará, dando lugar a virus ecotróficos, capaces de infectar una gran variedad de células de rata y ratón, o virus anfotróficos, capaces de infectar todo tipo de células de mamífero. Esta línea permite la obtención de altos títulos virales en pocos días mediante la transfección del VRG.

3.1.1.2. Vectores lentivirales

Los lentivirus son un tipo de retrovirus más complejo que poseen unos genes responsables del control de la transcripción y del transporte del ARN viral del núcleo al citoplasma. Gracias a estos genes los lentivirus pueden transportar de forma activa el ADN viral al núcleo de la célula infectada a través de los poros nucleares, permitiendo la transducción de células quiescentes. Los vectores lentivirales, al igual que los retrovirales, se generan sustituyendo los genes estructurales *gag*, *pol* y *env* por el gen terapéutico. En este caso, estos vectores se producen de forma transitoria mediante la cotransfección de un plásmido con la secuencia del vector lentiviral, otro con los genes estructurales *gag* y *pol* y un tercero con el gen *env* en la línea celular 293T.

3.1.1.3. Vectores adenoasociados

Los virus adenoasociados (VAA) son virus de ADN de cadena sencilla que necesitan la coinfección con adenovirus o virus del herpes simple para iniciar su ciclo de replicación viral. Además, la replicación del genoma del AAV y la formación de partículas virales requiere de la presencia de los genes estructurales *rep*, que codifica una replicasa, y *cap*, cuyo producto es la proteína de la cápside. Estos virus infectan todo tipo de células y, generalmente, integran su material genético en el brazo largo del cromosoma 19.³³ Esta integración específica permite la expresión estable del transgén y evita el riesgo de mutación insercional de los vectores virales enunciados anteriormente. Los vectores basados en los VAA se originan sustituyendo los genes *rep* y *cap*, implicados en la replicación del virus, por el gen terapéutico.

La producción de los vectores VAA se realiza en una línea celular empaquetadora que expresa de forma estable los genes *rep* y *cap*. Para ello, se transfecta un plásmido que contiene el ADN del vector VAA y otro plásmido que aporta los genes adenovirales indispensables para la replicación del VAA. La mayor desventaja de estos vectores es su ineficacia para transportar genes terapéuticos de un tamaño superior a las 4.7 kilobases.

Vector viral	Ventajas	Inconvenientes
Retrovirus	No induce inmunidad Biología bien estudiada	No transducen células quiescentes Posibilidad de mutación insercional
Lentivirus	Infectan todo tipo de células	Baja eficiencia de empaquetamiento en vectores con genes de gran tamaño
Adenoasociados	Pueden infectar células quiescentes Sitio de integración específico	Incapacidad de transportar genes de gran tamaño Producción ineficaz

Tabla 6. Ventajas e inconvenientes de los principales vectores virales de transferencia génica estable.

3.1.2. Vectores no virales

Los vectores no virales son considerados una alternativa a los vectores virales. Existen una gran variedad de vectores no virales entre los que encontramos sistemas tan diversos como la electroporación, los liposomas o los plásmidos episomales. En general, estas técnicas ofrecen seguridad, permiten transfectar células quiescentes y son sistemas relativamente sencillos. Existen tres ventajas principales comunes para todos estos vectores:

- La baja respuesta inmunológica que permite su administración repetida
- La posibilidad de transportar genes terapéuticos de gran tamaño
- La producción a gran escala

La principal desventaja de los vectores no virales es su baja eficiencia de transfección *in vitro* e *in vivo*, debido a la carencia de mecanismo especializado de internalización del ADN como en el caso de los virus. En el caso de los vectores no virales, el ADN tiene que llegar a la célula diana, sobrepasando las barreras extracelulares, internalizarse en la célula y transportarse al núcleo.³⁴ Para ello, se pueden utilizar diversas moléculas coadyuvantes que facilitan la internalización del ADN a las células, tales como lípidos o ligandos que se unen específicamente a receptores de la membrana celular. A continuación nos centraremos en los vectores no virales de transferencia génica estable más utilizados.

3.1.2.1. Sistemas basados en partículas

Estos sistemas se pueden dividir en tres grandes grupos dependiendo de si el ADN se combina con polímeros catiónicos (poliplexos), lípidos (lipoplexos) o nanopartículas coloidales (nanoplexos). Estos sistemas reducen el tamaño y la carga de la molécula de ADN, protegiéndolo de la degradación durante el proceso de transporte (nucleasas séricas) y facilitando la entrada del material terapéutico dentro de la célula. Se basan, principalmente, en la interacción electrostática entre el transportador cargado positivamente y el ADN cargado negativamente. Una vez formado el complejo, éste es atraído hacia la membrana celular cargada negativamente e introducido a la célula por endocitosis.

Lipoplexos

Los liposomas catiónicos son utilizados en terapia génica para recubrir el ADN terapéutico, protegiéndolo así de las nucleasas séricas y facilitando su entrada en el citoplasma de la célula diana. Esta estrategia ha sido utilizada para transportar citoquinas proinflamatorias³⁵ o genes suicidas³⁶ mediante la administración intratumoral en modelos animales. La combinación de

lipoplexos con polietilenglicol ha sido utilizada de forma sistémica para ayudar a estabilizar el complejo.³⁷ Otra combinación interesante, en este caso para potenciar el efecto terapéutico, ha sido la transferencia de genes quimiosensibilizadores (ARN antisentido del gen HER-2) o radiosensibilizadores (p53) mediante lipoplexos combinada con quimioterapia o radioterapia, respectivamente.^{38, 39}

Nanoplexos

Esta técnica se basa en la protección del ADN mediante nanoesferas o nanocápsulas. Estas nanopartículas pueden estar formadas por gelatina⁴⁰ o proteínas como la albúmina⁴¹ o el chitosan⁴². La incorporación del ligando $\alpha v \beta 3$ en un complejo formado por nanopartículas y lípidos catiónicos ha permitido dirigir selectivamente esta estructura hacia la vasculatura tumoral.⁴³ El transporte de la forma mutada del gen Raf-1 mediante estas nanopartículas modificadas ha permitido la eliminación de los tumores primarios y las metástasis en un modelo animal.^{44, 45}

3.1.2.2. Sistemas basados en plásmidos episomales

Un episoma es un elemento génico independiente que se mantiene dentro de la célula en forma de plásmido como un elemento extracromosomal. Los episomas transportan toda la información necesaria para su propia replicación, lo que significa, que una vez se introducen dentro de una célula puede generar copias de sí mismo sin necesidad de integrarse en un cromosoma.

El plásmido episomal pEPI-1

El plásmido pEPI-1 es un plásmido episomal de 6.7 kilobases que contiene un origen de replicación eucariota bajo un promotor potente (SV40) y regiones humanas de anclaje a la matriz nuclear (S/MAR) necesarias para la replicación extracromosómica y la segregación a las células hijas.⁴⁶ Para poderlo estudiar, este plásmido contiene un gen reportero (GFP) bajo el promotor constitutivo del citomegalovirus (CMV) (**Figura 3**). Se ha comprobado que las secuencias S/MAR interacciona de forma específica con la matriz nuclear y con elementos estructurales de los cromosomas como son las histonas.⁴⁷ Este vector se mantiene de forma estable dentro de una célula en ausencia de presión selectiva.⁴⁸ Este sistema de transferencia génica no viral ha sido utilizado para modificar génicamente fetos de cerdo con un gen reportero. Los resultados confirman la presencia episomal del plásmido y muestran una alta expresión del transgén en la mitad de los animales tratados.⁴⁹

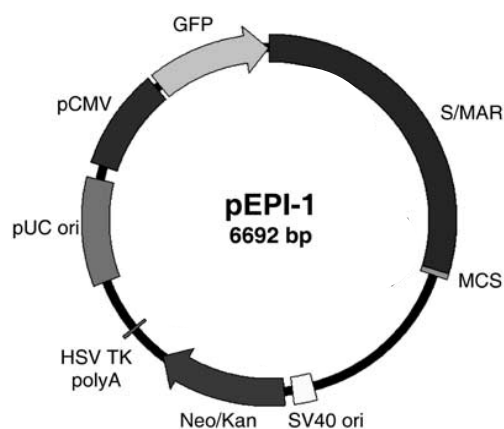


Figura 3. Mapa del pEPI-1. Este plásmido episomal contiene un origen de replicación eucariota bajo el promotor del virus del simio 40 (SV40), la región humana de anclaje a la matriz nuclear S/MAR y el gen de la GFP bajo el promotor del citomegalovirus (CMV). De Schaarschmidt et al. EMBO 2004.

En esta Tesis se ha utilizado el plásmido episomal pEPI-DHFR/TK para generar una línea tumoral de HCT116 que expresase de forma estable la proteína de fusión DHFR/TK.

3.1.2.3. Sistemas basados en transposones

Los transposones y las secuencias de inserción son elementos genéticos móviles que se integran en los cromosomas y, cada cierto tiempo, se transfieren del genoma de una célula a otra, lo que se denomina transposición. Se han encontrado transposones de ADN activos en el genoma de invertebrados y plantas, pero es muy raro encontrarlos en vertebrados, especialmente en mamíferos. A pesar de ello, el genoma de los vertebrados contiene transposones remanentes inactivos que no son capaces de transponerse debido a la acumulación de mutaciones. Se ha descubierto que los transposones además de llevar el gen de la transposasa, necesaria para el proceso de transposición, también pueden transportar genes no relacionados con este proceso, como el gen de resistencia a multidrogas MDR1.⁵⁰

El transposón *Sleeping beauty*

A finales de los años 90 se reconstituyó por mutagénesis un transposón de ADN activo en vertebrados a partir de la secuencia de un transposón silente de la familia del Tc1 presente en el genoma del salmón. A este transposón se le denominó *Sleeping Beauty*.⁵¹ Este elemento génico consiste en una secuencia de repeticiones invertidas terminales, a izquierda y derecha, (IRDR), de unas 340 pares de bases, que flanquean una secuencia de ADN, que puede ser sustituida por un gen de interés. El sistema consiste en la transferencia específica de este constructo desde un plásmido donador hacia un cromosoma celular. La excisión del transposón del plásmido donador y la integración dentro del cromosoma es mediada por la transposasa *Sleeping Beauty*, que puede ser transportada por el transposón o aportada a la célula mediante la transferencia de su ARNm. El transposón se integra de forma semialeatoria en las secuencias de dinucleótidos TA de los cromosomas. A pesar de ello, las evidencias no indican riesgo de mutación insercional.⁵²

Este proceso permite la expresión prolongada del transgén de interés, incluso en células con replicación activa como las células tumorales, evadiendo la respuesta inmune que se produce frecuentemente en el caso de los vectores virales.⁵³ Aunque la eficacia de transposición disminuye con el aumento del tamaño del inserto⁵⁴, el transposón *Sleeping Beauty* es capaz de transportar insertos de más de 10Kb. Este sistema es un excelente candidato para la terapia génica del cáncer y ha sido testado recientemente para transferir genes suicidas a las células tumorales *in vitro*.⁵⁵

3.2. Terapia con genes suicidas

La quimioterapia se utiliza, frecuentemente, en combinación con cirugía y con radioterapia en el tratamiento de los tumores malignos. Desafortunadamente, su poca especificidad restringe su utilización a una dosis limitante, muchas veces poco efectiva en pacientes. Si le añadimos la frecuente aparición de resistencias, esto plantea la necesidad de buscar nuevas estrategias terapéuticas. En estas últimas décadas han aparecido diversas estrategias para aumentar la selectividad de la quimioterapia contra el cáncer, entre las que encontramos la terapia con genes suicidas.

La terapia génica suicida es una parte de la terapia génica del cáncer que se basa en la transferencia de un gen suicida dentro de las células tumorales para poderlas eliminar de forma selectiva. En la mayoría de los casos, estos genes suicidas codifican enzimas que no están presentes en los mamíferos, garantizando así su selectividad. La expresión de estas enzimas dentro de una célula es necesaria y suficiente para convertir una prodroga inocua en un metabolito altamente tóxico para la célula. Al igual que la quimioterapia convencional, la prodroga es administrada sistémicamente, pero sólo tendrá su efecto tóxico en las células que hayan incorporado el gen suicida. Esta selectividad es la principal ventaja de este tipo de terapia en comparación con la quimioterapia convencional.

Esta terapia esta compuesta de dos etapas. La primera se basa en dirigir y expresar el gen suicida dentro de las células tumorales mediante vectores de transferencia génica. La segunda etapa consiste en la administración sistémica de la prodroga que será metabolizada selectivamente por la enzima exógena en las células tumorales, dando lugar a una sustancia citotóxica y a la muerte sucesiva de la célula diana (**Figura 4**). Este efecto antitumoral puede incrementarse gracias al efecto colateral o *bystander effect*. El efecto colateral se define como un mecanismo de amplificación del efecto citopático a partir de la transferencia de los metabolitos tóxicos de una célula que expresa el gen suicida a una célula adyacente que no lo expresa, induciéndole su muerte. El mecanismo de transferencia de estos compuestos tóxicos a las células vecinas depende de la permeabilidad de estos metabolitos. Así pues, los metabolitos permeables como el 5-FU, generado a partir del 5-FC, viajan de una célula a otra a través de las

membranas celulares por difusión pasiva. En cambio, los metabolitos impermeables, como las purinas o pirimidinas fosforiladas, no difunden a través de las membranas celulares y necesitan contactos célula-célula o uniones intercelulares *gap* para que se produzca el efecto colateral.⁵⁶ Ha sido postulado otro mecanismo de transferencia de metabolitos tóxicos que consiste en la endocitosis de fragmentos de células apoptóticas cargados de metabolitos.

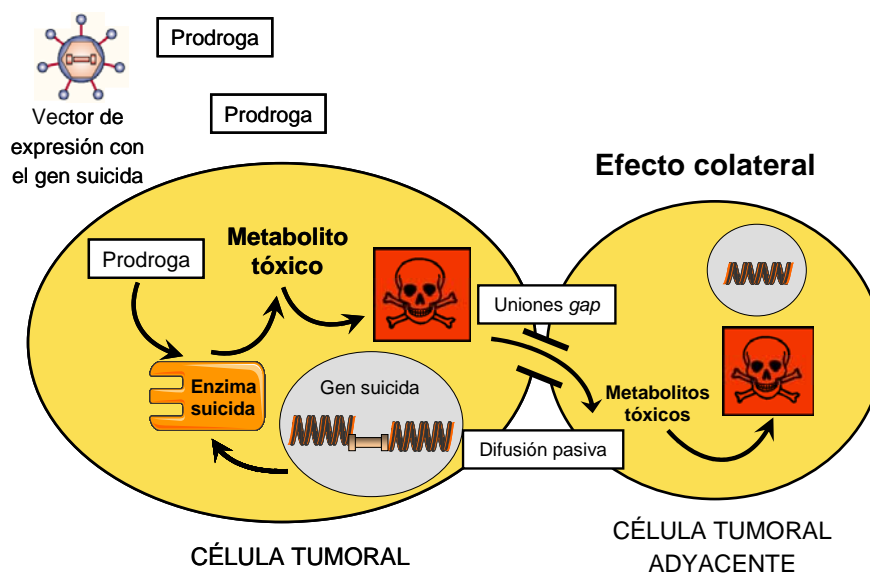


Figura 4. Mecanismo de acción de la terapia con genes suicidas. En primer lugar, la célula tumoral ha de ser transducida con un vector de expresión que transporte un gen suicida. Una vez se ha sintetizado la enzima suicida se administra sistémicamente una prodroga, inocua para el organismo. La enzima suicida exógena es capaz de convertir esta prodroga en una sustancia tóxica que induce la muerte de la célula tumoral. Estos metabolitos tóxicos se pueden transferir de una célula tumoral que expresa el gen suicida a una célula tumoral adyacente que no lo expresa por difusión pasiva o mediante las uniones intercelulares *gap*, causando así, la muerte de la célula tumoral vecina (efecto colateral).

Hasta ahora hemos estado hablando del efecto colateral a corta distancia. Existe otro mecanismo de amplificación del efecto tóxico de la terapia génica suicida que está mediado por el sistema inmune y se denomina efecto colateral a distancia. En este efecto intervienen tres factores inmunológicos:

- **La inmunogenicidad de los vectores.** La expresión de antígenos virales o bacterianos en las células tumorales puede estimular el sistema inmune del paciente, produciendo el reclutamiento y la activación de células inmunes efectoras, contribuyendo a combatir el microambiente inmunosupresor que se genera habitualmente en los tumores.⁵⁶⁻⁵⁸ Sin embargo, el desarrollo de una respuesta inmune contra proteínas expresadas en el vector de transferencia génica puede condicionar negativamente la eficiencia de posteriores

readministraciones de la terapia, debido a la destrucción o la neutralización de los vectores de transferencia antes de que alcancen el tejido diana.

- **La inmunogenicidad de las enzimas suicidas exógenas.** La naturaleza inmunogénica de las enzimas provenientes de otras especies puede tener efectos positivos al inducir una respuesta inmune en el tumor o negativos al neutralizar la enzima suicida.
- **La inducción de la inmunidad una vez eliminadas las células transducidas con el gen suicida.** Algunos grupos han documentado regresiones tumorales en ratones inmunocompetentes con más de un tumor donde sólo uno de ellos había sido transducido con un gen suicida.⁵⁹⁻⁶¹ En relación con estos resultados, estudios demuestran que las células que se mueren por efecto de la terapia suicida pueden activar la respuesta inmune mediada por los asesinos naturales (NK) y los linfocitos T.^{59, 60} Este efecto beneficioso se denomina efecto colateral a distancia⁶² e incrementa el efecto antitumoral de la terapia génica suicida.

El sistema suicida más estudiado hasta el momento es la combinación del gen suicida Timidina Quinasa del virus del *Herpes simple* tipo 1 (HSV-TK) y la prodroga ganciclovir (GCV). Aún así, existen otros sistemas suicidas como la citosina deaminasa (CD) combinada con la 5-fluorocitosina (CD/5-FC), el gen de fusión citosina deaminasa-uracil fosforibosil transferasa combinado con el 5-FC (FCU/5-FC), la nitroreductasa combinada con el CB1954 (NTR/ CB1954) o el citocromo P450 2B1 combinado con la ifosfamida o la ciclofosfamida (CYP2B1/IFO o CPA). En la **Tabla 7** se detallan las principales características de estos sistemas suicidas.

3.2.1. El sistema Timidina Quinasa/Ganciclovir (TK/GCV)

El primer sistema suicida desarrollado como estrategia contra el cáncer y el más utilizado hasta el momento es el sistema TK/GCV. El gen de la TK proviene del virus *Herpes simple* y la prodroga GCV es ampliamente utilizada para el tratamiento de infecciones causadas por este tipo de virus.

Para una buena eficiencia del sistema TK/GCV se necesita una expresión estable del gen suicida dentro de la célula tumoral y la presencia de uniones intercelulares *gap*, que permiten la generación del efecto colateral. Este sistema ha sido extensamente estudiado tanto *in vitro* como *in vivo* para el tratamiento de enfermedades neoplásicas. Además, una de las ventajas de este sistema suicida es la detección del gen de la TK mediante tomografía de emisión de positrones (PET)⁶³, lo que permite la monitorización del gen terapéutico *in vivo* mediante un método de imagen no invasivo.

Gen	Origen	Prodroga	Metabolito tóxico	Mecanismo de acción	Dependencia ciclo celular	Mecanismo del efecto adyacente
Timidina Quinasa (TK)	Virus Herpes simple (HSV)	Ganciclovir (GCV)	Ganciclovir trifosforilado (GCV-TP)	Bloqueo de la síntesis de ADN	Sí	Uniones <i>gap</i>
Citosina Deaminasa (CD)	<i>E. coli</i> <i>S. cerevisiae</i>	Fluorocitosina (5-FC)	Fluorouracil (5-FU)	Inhibición de la síntesis de ADN y ARN	Sí	Difusión pasiva
Citosina Deaminasa/Uracil fosforibosil transferasa (FCU)	<i>E. coli</i> <i>S. cerevisiae</i>	Fluorocitosina (5-FC)	Fluorouracil (5-FU)	Inhibición de la síntesis de ADN y ARN	Sí	Difusión pasiva
Nitroreductasa (NTR)	<i>E. coli</i>	CB 1954	5-(Aziridin-1-yl)-4-hydroxylamino-2-nitrobenzamide	Uniones cruzada en el ADN	No	Difusión pasiva
Citocromo P450 2B1 (CYP2 B1)	Rata, humano y conejo	Ciclofosfamida Ifosfamida	Mostaza fosforamida	Uniones cruzada en el ADN	No	Difusión pasiva
Carboxilesterasa (CE)	Conejo y humano	Irinotecan, capecitabina y paclitaxel-2-etilcarbonatado	SN-38, 5-FU, Paclitaxel	Bloqueo de la síntesis de ADN mediante la inhibición específica de la topoisomerasa I del ADN	Sí	Difusión pasiva
B-glucosidasa (linamarasa)	Planta de la Cassava	Linamarina	Cianida	Bloqueo de la cadena respiratoria mitocondrial	No	Difusión pasiva
Carboxipeptidasa A1	Humano y rata	Péptidos metotretaxatos	Metotrexato	Uniones cruzada en el ADN	No	Difusión pasiva

Tabla 7. Principales sistemas suicidas. En esta tabla se muestran los sistemas suicidas más utilizados hasta el momento y sus características principales.

3.2.1.1. Fundamento y mecanismo de acción

La enzima HSV-TK, gracias a su baja especificidad, es capaz de fosforilar, además de su sustrato natural (2'deoxyguanosina), análogos de nucleósidos como el GCV (**Figura 5**).⁶⁴

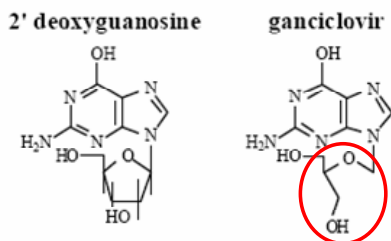


Figura 5. Estructura química del nucleósido 2'deoxyguanosina y de su análogo ganciclovir (GCV). De Fillat et al. 2003 Current Gene Therapy.

La HSV-TK cataliza la primera fosforilación y el resto de fosforilaciones se realizan por las quinasas celulares guanilato quinasa y fosfoglicerato quinasa (**Figura 6**). Debido a su alta analogía con el nucleósido endógeno trifosfato, el GCV trifosforilado se comporta como un sustrato de la ADN polimerasa. Al carecer del grupo hidroxilo en la posición 3' del anillo desoxiribosa, la enzima encargada de la síntesis de ADN no puede catalizar la unión fosfodiéster con el siguiente nucleótido, y esto lleva a inhibición de la proliferación celular y/o la muerte por apoptosis.⁶⁵

Una vez el GCV trifosforilado ha inducido la muerte de la célula transducida con el gen de la TK, este metabolito tóxico puede propagarse a las células vecinas no transducidas con el gen suicida mediante las uniones *gap*, produciendo el ya mencionado efecto colateral.

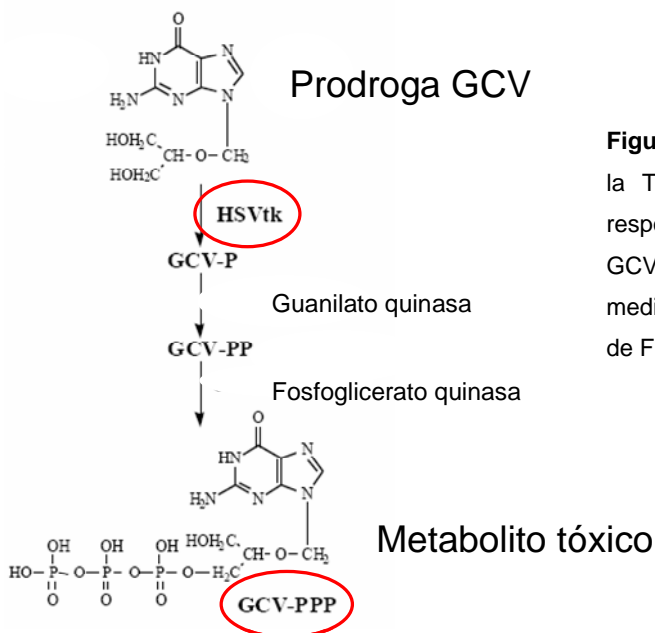


Figura 6. Ruta metabólica del GCV. El gen de la TK del virus del *Herpes Simple* es la responsable de la primera fosforilación del GCV. Las otras dos fosforilaciones son mediadas por quinasas celulares. Adaptada de Fillat et al. 2003 Current Gene Therapy.

3.2.1.2. Aumento de la eficacia

El objetivo de la terapia con genes suicidas mediada por el gen de la HSV-TK es inducir un efecto citotóxico en la célula diana tumoral mediante la expresión exógena de la HSV-TK y la administración sistémica de GCV. El sistema TK/GCV ha demostrado su capacidad de erradicar tumores en modelos preclínicos⁶⁵. Aún así, el efecto terapéutico obtenido en los ensayos clínicos ha sido muy reducido (ver apartado 3.3. experiencia clínica de la terapia con genes suicidas). Por este motivo, numerosos grupos están trabajando en diferentes estrategias para mejorar la eficacia terapéutica de este sistema suicida.

- **Mejora de la eficiencia de transducción de los vectores transportadores.** Se ha demostrado que la modificación de los vectores adenovirales con pequeños motivos peptídicos como el Arg-Gly-Asp (RGD) o el pK7 mejora su eficiencia de transducción.^{66 67} El uso del motivo peptídico pK7 en la fibra adenoviral mejora la unión a heparan sulfatos y permite cuadruplicar la transducción de células de músculo esquelético *in vivo*.⁶⁸ En cambio, el motivo RGD promueve la unión a integrinas, altamente expresadas en tumores. La presencia de este motivo en la fibra adenoviral duplica la eficiencia de transducción del adenovirus salvaje en un modelo murino con tumores subcutáneos de cáncer de ovario.⁶⁷ Una vez se finalicen los estudios de bioseguridad, se ha programado un estudio piloto en pacientes con carcinoma de ovario para probar la aplicación local de un adenovirus con la modificación RGD.⁶⁹
- **Selección de mutantes del gen HSV-TK.** El mutante SR39 ha mostrado una selectividad aumentada por el GCV con una IC50 casi 300 veces inferior a la enzima natural.⁷⁰ Este aumento en la afinidad por el GCV permite la regresión de los tumores con dosis de GCV diez veces inferiores a las utilizadas normalmente.⁷⁰
- **Mejoras en el efecto colateral.** Como ya se ha comentado, el efecto colateral del sistema TK/GCV es dependiente de la presencia de uniones *gap* en las células diana. Existen ciertos tipos de tumores, como los carcinomas colorectales, con una expresión muy baja de uniones *gap*.⁷¹ Para solucionar este problema se ha explorado diversas opciones entre las que encontramos:
 - Incorporación de dominios de transducción de proteína (*tat* o VP22) en el gen de la TK para permitir la difusión pasiva de la proteína entre célula-célula.^{72, 73}

- Coexpresión de la conexina 43, principal componente de las uniones *gap*, junto con el gen de la TK, para facilitar la formación de este tipo de uniones.⁷⁴
 - Estimulación farmacológica de la expresión de las conexinas implicadas en las uniones *gap*. Destacamos los compuestos n-butilato⁷⁵ y hidroxiourea⁷⁶ y las drogas apigenina y lovastatina⁷⁷.
- **Combinación con otras terapias.** Para aumentar su eficacia, el gen de la TK se ha combinado con endostatinas (inhibidores de la angiogénesis)⁷⁸, con otros genes suicidas como la CD⁷⁹, el CYP2B1⁸⁰ o la Guanilato Quinasa⁸¹, con citoquinas como la IL2⁸² o la IL12⁸³, con radiosensibilizadores⁸⁴ y con quimioterápicos como la gemcitabina⁸⁵.

Todas las mejoras enunciadas anteriormente se basan en incrementar la llegada de los genes suicidas a las células tumorales o en aumentar el efecto colateral. En la presente tesis, pretendemos aumentar la eficacia de la terapia génica suicida enriqueciendo el número de células que expresan un gen suicida después de la transducción del tumor.

3.2.2. El sistema Citosina Deaminasa/ 5-fluorocitosina (CD/5-FC)

El sistema (CD/5-FC), al igual que el sistema TK/GCV, se basa en la producción de un análogo tóxico de los nucleótidos. La enzima CD de *Escherichia Coli* (*E.Coli*) convierte la prodroga fluorocitosina (5-FC) en el metabolito tóxico fluorouracil (5-FU), que inhibe la enzima timidilato sintasa, bloqueando así, la síntesis de ADN y ARN y induciendo la muerte celular por apoptosis.⁸⁶ El efecto colateral del sistema CD/5-FC es independiente de las uniones célula-célula debido a la habilidad del compuesto tóxico 5-FU de difundir pasivamente entre células.⁸⁷ Gracias a su gran efecto colateral, este sistema ha demostrado eficacia *in vitro* e *in vivo* en modelos tumorales.⁸⁸ Además, los ensayos clínicos realizados en pacientes han confirmado que el tratamiento es seguro y bien tolerado.⁸⁹

3.2.3. El sistema CD-uracil fosforibosiltransferasa fusionado/5-FC (FCU/5-FC)

El gen FCU⁹⁰ es un gen sintético formado por la fusión del gen CD y el gen de la uracil fosforibosil transferasa (UPRT) de *E.Coli*, implicado en la formación de pirimidinas. La CD convierte el 5-FC en 5-FU y el UPRT fosforila este 5-FU dando lugar a los metabolitos tóxicos que inducen la muerte de la célula (**Figura 7**). La combinación de estos dos genes ha mostrado un gran efecto colateral local⁹⁰ y a distancia⁶¹ que permite aumentar la actividad antitumoral del

sistema CD/5-FC⁹¹. La seguridad y la eficacia de este sistema han sido confirmadas en varios estudios preclínicos.⁹²⁻⁹⁴

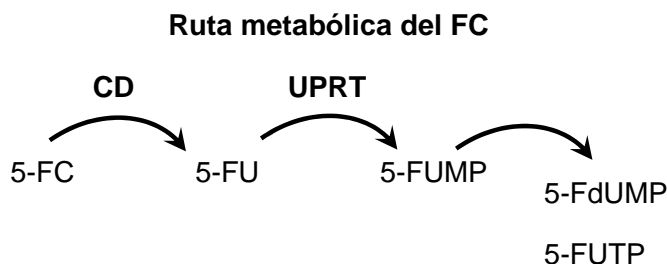


Figura 7. Ruta metabólica del 5-FC. El 5-FC es convertido a 5-FU por la CD y, a su vez, la UPRT fosforila el 5-FU a 5-Fluorouracilmonofosfato (5-FUMP). Este 5-FUMP originado da lugar de forma directa a sus metabolitos tóxicos 5-Fluorodeoxiuracilmonofosfato (5-FdUMP) y 5-Fluorouraciltrifosfato (5-FUTP).

3.2.4. El sistema Nitroreductasa/CB1954 (NTR/CB1954)

La enzima NTR de *E.Coli B*, codificada por el gen *nfsB*, es capaz de convertir el agente alquilante CB1954 en un agente citotóxico que genera uniones cruzadas en el ADN genómico e induce la muerte celular por apoptosis. Una de las ventajas del sistema NTR/CB1954 es que, a diferencia de los sistemas mencionados anteriormente, no depende de ciclo celular para inducir su toxicidad.⁹⁵ Este sistema ha demostrado un gran efecto colateral en ausencia de uniones intercelulares, tanto *in vitro*⁹⁶ como *in vivo*⁹⁷. Para incrementar su potencia se han generado mutantes (F124K) con una eficiencia superior para activar la CB1954.⁹⁸ Igual que los otros sistemas suicidas, éste presenta un efecto colateral a distancia mediado por el sistema inmune. Para potenciar este efecto, se han generado vectores que combinan el gen *nfsB* con un gen estimulador del sistema inmune como el GM-CSF.⁹⁹

Hasta el momento, los resultados de los dos ensayos clínicos realizados en pacientes han mostrado seguridad y han confirmado la presencia y la expresión del transgén en las células tumorales (ver apartado 3.3. experiencia clínica con genes suicidas).

3.2.5. El sistema citocromo P450 2B1/fosfamida (CYP2B1/IFO o CPA)

La proteína citocromo P450 2B1 es una enzima humana que se expresa mayoritariamente en el hígado y tiene la función de metabolizar sustancias tóxicas, tanto endógenas como exógenas. Esta enzima es la isoforma más activa de la familia CYP y es capaz de convertir los compuestos quimioterapéuticos isofosfamida (IFO) o ciclofosfamida (CPA) en sus metabolitos tóxicos, cuya vida media es muy corta. Esta terapia génica suicida permite incrementar el efecto citotóxico en la proximidad del tumor, reduciendo la dosis de prodroga y la toxicidad sistémica asociada.

Al igual que el sistema NTR/CB1954, este sistema es independiente de ciclo celular ya que los metabolitos tóxicos generan uniones cruzadas en el ADN genómico, induciendo la muerte celular por apoptosis.¹⁰⁰ Numerosos estudios han demostrado la eficacia terapéutica *in vivo* del sistema CYP2B1/CPA^{80, 101} y la presencia de un potente efecto colateral¹⁰² que no requiere uniones célula-célula¹⁰³.

3.3. Experiencia clínica de la terapia con genes suicidas

Hasta el momento, el sistema suicida más utilizado en los ensayos clínicos de terapia génica ha sido el sistema TK/GCV. En la última década se han llevado a cabo diversos ensayos clínicos de fase I (ensayo de seguridad), II (ensayo de seguridad y eficacia terapéutica en un único centro) y III (ensayo de seguridad y eficacia terapéutica multicéntrico) utilizando la administración localizada de diversos vectores para transferir el gen suicida a diferentes tipos de tumores. En la **Tabla 8** se enumeran los ensayos clínicos con genes suicidas más relevantes. Teniendo en cuenta los resultados obtenidos en estos ensayos clínicos, se puede concluir que es factible transferir y expresar un gen suicida en una gran variedad de tumores mediante diversos tipos de vectores. En ninguno de los ensayos clínicos de bioseguridad se ha observado dosis limitantes ni efectos adversos importantes después del tratamiento. Aún así, algunos efectos adversos leves han sido relacionados con los vectores virales utilizados. Los ensayos clínicos de eficacia han mostrado que la gran mayoría de los pacientes no obtienen ningún beneficio después del tratamiento con genes suicidas.¹⁰⁴⁻¹⁰⁶ Sin embargo, en algunos casos se ha observado disminución de marcadores tumorales, como el antígeno específico de próstata¹⁰⁷, retraso en la progresión de la enfermedad^{105, 108}, algunas respuestas clínicas parciales comparadas con el tratamiento estándar^{109, 110} y en muy pocos caso respuestas totales¹¹¹ relacionadas exclusivamente con la terapia génica suicida. Los primeros ensayos clínicos con genes suicidas se realizaron con vectores retrovirales. A pesar de la gran experiencia con este tipo de vectores, en estos últimos años, se han utilizado mayoritariamente los vectores adenovirales debido a su mayor eficacia de transducción.¹¹² Aún así, esta eficiencia de transducción sigue siendo muy limitada y son necesarias nuevas aproximaciones destinadas a aumentar los niveles de transducción, requisito indispensable para obtener resultados significativos en la clínica. Para incrementar la eficacia de la terapia génica suicida, ésta se ha combinado con cirugía¹¹³, con citoquinas estimuladoras del sistema inmune (IL-2)¹⁰⁹ o con radioterapia¹¹⁴.

La vía de administración de los genes suicidas de todos los ensayos clínicos realizados hasta el momento ha sido localizada (intratumoral o intraperitoneal, principalmente), incluso en pacientes con tumores diseminados. La única aproximación de administración sistémica de los vectores con genes suicidas fue en el 2001 por Lohr y colaboradores.¹¹⁰ A pesar de ello, esta administración fue por angiografía localizada en las arterias que alimentan el tumor primario del

páncreas (arteria pancreatoduodenal, la arteria dorsal pancreática o la arteria gastroduodenal que pasa por la cabeza del páncreas).¹¹⁰ Todavía no se ha realizado ningún ensayo clínico mediante la administración sistémica generalizada de vectores que expresen genes suicidas. Esta aproximación es un requisito indispensable para el tratamiento efectivo de los tumores metastáticos.

3.4. Limitaciones de la terapia génica suicida

Principalmente, en la terapia génica suicida existen tres limitaciones:

- **El bajo nivel de transducción de las células tumorales en los pacientes.**¹¹⁵ Se ha comprobado que gracias al efecto colateral y la respuesta inmune antitumoral indirecta no es necesario la transducción de todas las células del tumor para poder eliminarlo¹¹⁶, pero se considera necesario un nivel mínimo de transducción del 10% de las células tumorales para observar regresiones tumorales.^{117, 118} Los vectores utilizados hasta el momento no permiten obtener proporciones de transducción tan altas en pacientes.¹¹⁹ Además, la poca transducción que se consigue es muy heterogénea dentro del tumor¹¹² y entre pacientes de un mismo ensayo clínico¹²⁰.

Para paliar esta limitación, en los últimos años, se han diseñado virus oncolíticos genéticamente modificados (adenovirus, virus del herpes simple y reovirus) portadores de genes suicidas. A pesar de no existir sinergismo, estos virus combinan la eficacia de la viroterapia en sí con la eficacia de la terapia génica suicida.¹²¹

- **La llegada de los genes suicidas a las células tumorales.** Esta limitación se ha resuelto mediante la inyección local de los vectores suicidas. Sin embargo, hay que tener en cuenta que la principal causa de mortalidad de los pacientes con enfermedad neoplásica no es el tumor primario sino las metástasis diseminadas. Por este motivo, es muy importante mejorar la biodistribución y la selectividad de los vectores hacia las células tumorales, así como mantener su seguridad, para su futura aplicación sistémica en pacientes. Para mejorar la biodistribución de los vectores, hay que tener en cuenta su biodisponibilidad, altamente dependiente de la irrigación de los tumores, y el tropismo del vector por tejidos distintos del tejido diana (por ejemplo, el tropismo de los adenovirus hacia el hígado). En el tratamiento de metástasis hepáticas, el órgano diana es el hígado. Cabría esperar que un buen candidato para el tratamiento de las metástasis hepáticas pudiera ser el adenovirus, pero esta estrategia no sería correcta ya que el tejido diana son las lesiones tumorales hepáticas y no el parénquima hepático.

Fase Clínica	Tumor	Vector	Sistema Suicida	Vía Administración	Referencia
Fase I/II	Glioblastoma	Células productoras de retrovirus	TK/GCV	Intratumoral	(Ram, Culver et al. 1997) ¹²²
Fase I/II	Glioblastoma	Células productoras de retrovirus (M11)	TK/GCV	Inyección local después de la resección quirúrgica	(Klatzmann, Valery et al. 1998) ¹²³
Fase I	Cáncer de Próstata	Adenovirus	TK/GCV	Intraprostático	(Herman, Adler et al. 1999) ¹²⁴
Fase I	Cáncer de Mama	Plásmido	CD/5-FC	Intratumoral	(Pandha, Martin et al. 1999) ⁸⁹
Fase II	Glioblastoma	Células productoras de retrovirus	TK/GCV	Inyección local después de la resección quirúrgica	(Shand, Weber et al. 1999) ¹²⁵
Fase I	Cáncer cerebral	Adenovirus	TK/GCV	Intratumoral	(Trask, Trask et al. 2000) ¹²⁶
Fase III	Glioblastoma	Retrovirus	TK/GCV	Intratumoral	(Rainov 2000) ¹⁰⁴
Fase I	Cáncer de ovario	Adenovirus	TK/GCV	Intraperitoneal	(Alvarez, Gomez-Navarro et al. 2000) ¹⁰⁵
Fase I/II	Cáncer de Páncreas	Células alogénicas modificadas	P450/isofosfamida	Angiografía selectiva	(Lohr, Hoffmeyer et al. 2001) ¹¹⁰
Fase II	Cáncer de Colon metastásico	Adenovirus	TK/GCV	Intratumoral	(Sung, Yeh et al. 2001) ¹²⁷
Fase I/II	Cáncer de ovario	Adenovirus	TK/GCV + topotecan	Intraperitoneal después de la resección quirúrgica	(Hasenburg, Tong et al. 2001) ¹²⁸
Fase I	Cáncer de próstata	Adenovirus	CD-TK/5-FC+vGCV	Intraprostático	(Freytag, Stricker et al. 2003) ¹²⁹
Fase I/II	Glioblastoma	Adenovirus	TK/GCV	Inyección local después de la resección quirúrgica	(Immonen, Vapalahti et al. 2004) ¹¹³
Fase I	Cáncer de hígado	Adenovirus	NTR/CB1954	Intratumoral	(Palmer, Mautner et al. 2004) ¹³⁰
Fase II	Mesotelioma pleural	Adenovirus	TK/GCV	Intraleural	(Sterman, Recio et al. 2005) ¹⁰⁶
Fase I/II	Glioblastoma	Células productoras de retrovirus	TK/GCV + IL-2	Intratumoral	(Colombo, Barzon et al. 2005) ¹⁰⁹
Fase I	Cáncer de mama o melanoma	Retrovirus	P450/ciclofosfamida	Intratumoral	(Braybrooke, Slade et al. 2005) ¹³¹
Fase I/II	Retinoblastoma	Adenovirus	TK/GCV	Intravítreo	(Chevez-Barrios, Chintagumpala et al. 2005) ¹¹¹
Fase I	Cáncer de próstata	Adenovirus	CD-TK _{sr39} /5-FC+vGCV	Intraprostático	(Freytal, Movsas et al. 2007) ¹¹⁴
Fase I	Cáncer de próstata	Adenovirus	TK/GCV	Intraprostático	(Nasu, Saika et al. 2007) ¹⁰⁷
Fase I	Cáncer de próstata	Adenovirus	CD-TK _{sr39} /5-FC+vGCV	Intraprostático	(Barton, Stricker et al. 2008) ¹³²
Fase I/II	Cáncer de próstata	Adenovirus	NTR/CB1954	Intraprostático	(Patel, Young et al. 2009) ¹³³

Tabla 8. Principales ensayos clínicos realizados con genes suicidas ordenados según el año de publicación.

Para abordar el problema de la selectividad, desde hace muchos años, se están usando distintos promotores específicos de tumor o de tejido, como el del antígeno carcinoembrionario, el del antígeno específico de próstata o el de la α -fetoproteína, para restringir la expresión de los genes terapéuticos a las células tumorales.¹³⁴

- **La biodistribución de la prodroga.** La prodroga, al ser administrada sistémicamente, ha de distribuirse por todo el organismo y sobrepasar las barreras del sistema capilar tumoral para poder llegar a las células tumorales transducidas con el gen suicida. En el caso de los tumores cerebrales, es necesario que además la prodroga pueda superar la barrera hematoencefálica. Atendiendo a los resultados de los ensayos clínicos realizados parece que la biodistribución sistémica de las prodrogas utilizadas no supone una gran limitación.

Otras limitaciones podrían ser la resistencia adquirida a la prodroga por parte de las células transducidas con el gen suicida, el bajo efecto colateral debido a la falta de uniones *gap* en algunos tipos de tumores⁷¹ y la alta proporción de células tumorales que no están dividiéndose y que, por lo tanto, son insensibles al efecto de algunos sistemas suicidas como el TK/GCV o el CD/5-FC.

En esta tesis nos proponemos aumentar el número de células tumorales modificadas con genes suicidas, la principal limitación de la terapia suicida, mediante la selección positiva de las células modificadas en el tumor. Para ello, las células tumorales modificadas con un gen suicida (TK) fueron transducidas con un gen de selección a drogas (DHFR o MDR1). Dicho gen confiere una ventaja selectiva a las células modificadas con el gen suicida y permite la selección de estas células frente a las células tumorales sin modificar, en presencia de una droga de selección. Partiendo de tumores con una pequeña proporción de células transducidas, este enriquecimiento permite mejorar la terapia génica suicida.^{15, 118}

Para mejorar la llegada de los genes suicidas a las células tumorales por vía sistémica proponemos el uso de las células madre mesenquimales (MSC). En los últimos años se ha demostrado que estas células presentan un tropismo por las regiones de inflamación¹³⁵ y por el parénquima tumoral^{93, 136}. En este trabajo se han utilizado MSC de origen fetal por presentar una alta tasa replicativa *in vitro*. Dichas células modificadas con el gen de selección MDR1 y el gen suicida FCU han mostrado una repoblación eficiente de las células tumorales en presencia de una droga de selección.

4. MECANISMOS PARA SELECCIONAR UNA POBLACIÓN CELULAR

En el apartado anterior hemos mencionado que la mayor limitación de la terapia con genes suicidas es la baja eficiencia de transferencia génica. Una estrategia para abordar esta limitación es seleccionar positivamente las células portadoras de los genes suicidas dentro del tumor. Existen varias aproximaciones para enriquecer una población modificada genéticamente *in vivo*, entre las que remarcamos la competición celular y la selección con genes de resistencia a drogas.

4.1. La competencia celular como estrategia de enriquecimiento

La posibilidad de que las células de un organismo multicelular pudiesen competir entre ellas se postuló, por primera vez, hace más de un siglo. En concreto, fue en 1888, cuando Wilhelm Roux propuso la idea de la lucha celular por la supervivencia durante el desarrollo de un organismo. El doctor Roux transfirió la teoría de Charles Darwin de la lucha por la existencia a la lucha entre células o entre tejidos celulares. En concreto, él se refirió a los procesos patológicos en los que las células de un tejido invaden otros. Esta idea causó mucha controversia ya que, hasta el momento, se pensaba que las células de un organismo multicelular más que luchar cooperaban entre ellas. Años más tarde, Santiago Ramón y Cajal volvió a refrescar esta idea. En sus estudios sobre la estructura del sistema nervioso, sugirió que durante la neurogénesis, las neuronas competían por el espacio y los nutrientes, idea que fue corroborada por la doctora Rita Levy-Montalcini tras el descubrimiento de los factores de crecimiento a mediados del siglo XX.¹³⁷

4.1.1. Competencia entre células normales y células con una desventaja proliferativa

Las células requieren señales de sus vecinas para sobrevivir, promoviendo así la cooperación.¹³⁸ El problema surge cuando los factores de crecimiento o el espacio requeridos para la supervivencia celular son limitados. En este escenario algunas células han de morir para que otras puedan sobrevivir y esta muerte puede producirse mediante una competición activa. La primera evidencia de competición entre células se obtuvo en un experimento en *Drosophila* donde se mezclaron células normales y células con el metabolismo celular disminuido debido a una mutación en los genes ribosomales (*Minutes*). La monitorización del crecimiento de las dos poblaciones a lo largo del tiempo mostró un aumento en el número de las células normales ligado con una disminución progresiva del número de células *Minutes*, sin un aumento del número total de células del tejido.¹³⁹ Esto indicaba que las células normales habían crecido a expensas de la muerte por apoptosis de las células *Minutes* (**Figura 8**).¹⁴⁰

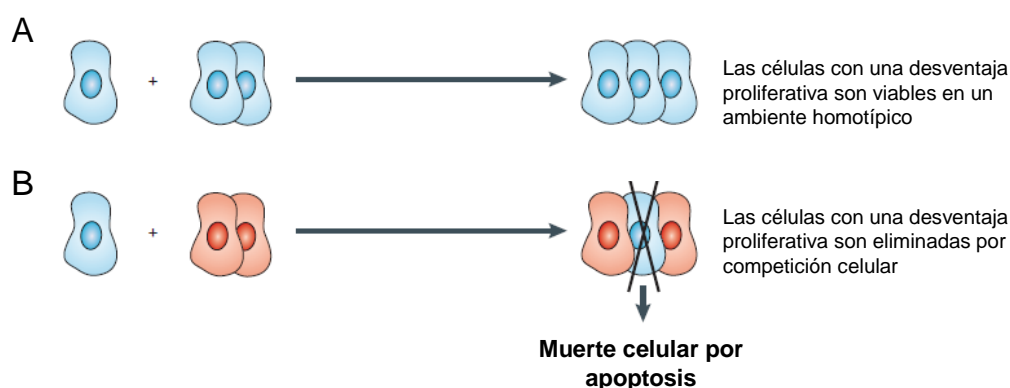


Figura 8. La competición celular entre células normales y células con una desventaja proliferativa. Las células con una desventaja proliferativa (azules) son viables cuando están rodeadas de células con el mismo genotipo (**A**). Sin embargo, cuando estas células entran en contacto con células normales (rojas) se genera una competición celular. En este proceso, las células normales inducen la apoptosis de las células con una desventaja proliferativa y acaban colonizando todo el territorio (**B**). Adaptado de Moreno et al. Nature Reviews 2008.

En general, cualquier mutación que reduzca el metabolismo celular puede originar una competición celular entre las células normales y las células mutadas. Esto resulta en una victoria de las células normales sobre las células mutadas, que a pesar de ser viables en ausencia de células normales, acaban siendo eliminadas después de la competición celular.¹⁴¹ El fenómeno de competición celular, inicialmente observado en *Drosophila*, también ha sido documentado en ratón.¹⁴² Otras evidencias sugieren que los patrones aleatorios de proliferación y apoptosis que se observan normalmente durante el desarrollo embrionario en mamíferos no son más que el inicio de una continua lucha entre las células por colonizar los tejidos.¹⁴³ Esta situación es muy probable que también ocurra durante la renovación de los tejidos adultos, donde el espacio es limitado.

Hasta el momento hemos hablado de una competición celular iniciada por una limitación de factores de crecimiento o de espacio. Algunos estudios muestran que la competición celular también se puede originar en un escenario con factores de crecimiento ilimitados. En este caso, las células comparan sus respectivos niveles de factores intracelulares mediante las uniones célula-célula e inducen la apoptosis de las células menos eficientes (**Figura 9**).¹⁴³

Otro ejemplo de este proceso es la competencia que se genera en los nichos de células madre del epitelio colónico para regular el balance entre la renovación de las células madre y la diferenciación. Igual que en el caso anterior, las células madre menos preparadas se acaban muriendo, mientras que las más preparadas siguen dividiéndose.¹⁴⁴ De esta forma, la competición celular actúa como un mecanismo fisiológico de control de calidad de las células de un tejido, maximizando así su eficacia.¹⁴³ Esta lucha celular podría ser utilizada terapéuticamente para combatir procesos como la degeneración funcional.

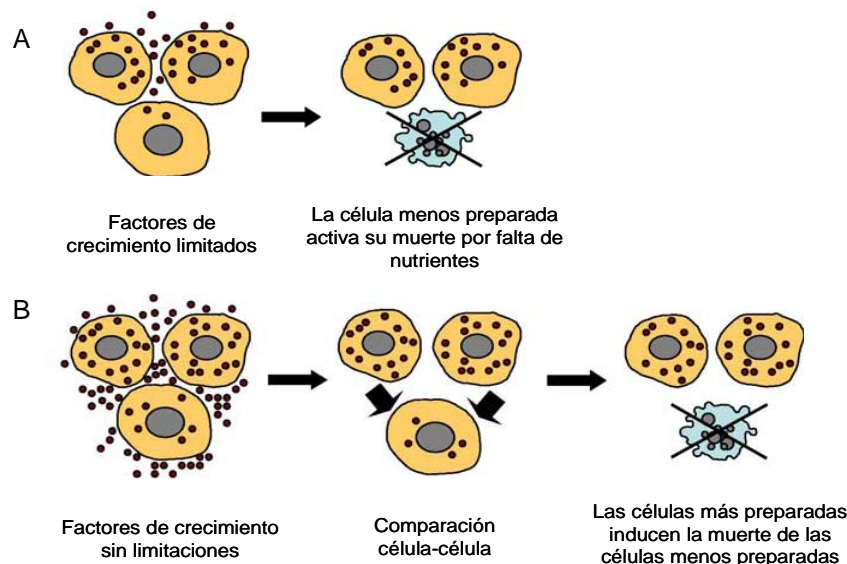


Figura 9. La competencia celular programada como mecanismo de selección de las células más preparadas dentro de una población celular. La selección celular en una población con factores de crecimiento limitados. En este escenario, sólo aquellas células que pueden captar los niveles suficientes de factores de crecimiento podrán sobrevivir (**A**). La selección celular en una población donde todas las células tienen suficientes factores de crecimiento para sobrevivir. A pesar de la abundancia de factores de crecimiento, no todas las células están igualmente preparadas. Las células más competitivas envían señales de muerte a las otras células. En esta situación, las células menos preparadas, que podrían sobrevivir por sí solas, son eliminadas por la presencia de unas células más competitivas (**B**). Adaptado de Moreno et al. *Experimental Cell Research* 2005.

4.1.2. Competencia entre células con una ventaja proliferativa y células normales

La competencia celular no sólo se produce entre células normales y células con una desventaja proliferativa. En estos últimos años, se ha propuesto que los oncogenes de la familia *myc* confieren una ventaja proliferativa y pueden transformar las células en supercompetidores capaces de expandirse mediante la inducción de la apoptosis de las células normales de alrededor, en un proceso donde el número de células se mantiene inalterado y no hay cambios visibles en el tejido.¹⁴⁵ El resultado final de este proceso es un enriquecimiento de las células más competentes (selección positiva). La generación de poblaciones supercompetidoras se ha relacionado con procesos patológicos durante los cuales células de una región empiezan a invadir el territorio ocupado por otra población. Recientemente, se ha especulado que la competencia celular puede estar implicada en los primeros estadios del cáncer.^{146, 147} Las células tumorales compiten por el espacio, los nutrientes y los factores de crecimiento. El aspecto más sorprendente de este proceso es que el crecimiento de las células con una ventaja proliferativa va acompañado de la muerte por apoptosis de las células vecinas. Si se inhibe la apoptosis de las células normales las células supercompetidoras no pueden expandirse. Para utilizar este conocimiento en el tratamiento contra el cáncer, se han sugerido terapias basadas en la

inhibición de la ventaja proliferativa de las células supercompetidoras o en la inhibición de la apoptosis de las células normales de alrededor del tumor.¹⁴¹

4.1.3. Competencia entre células tumorales

Los tumores están compuestos por células tumorales genéticamente heterogéneas. Esta variabilidad genética permite que el tumor se adapte a las condiciones del medio en cada momento. Cuando se le aplica un estímulo externo al tumor, se genera una competición celular entre las células tumorales que promueve la selección y la sobreproliferación de las más competentes y la muerte del resto de células tumorales.¹⁴⁶ Como ya se comentó anteriormente, el tratamiento de los tumores con una droga de selección induce la muerte de las células sensibles y la selección natural de las resistentes, que acaban colonizando todo el tumor. Así pues, el tratamiento con dicha droga genera una presión selectiva que enriquece las células resistentes dentro del tumor.

En esta tesis, sugerimos la utilización de la competición celular como terapia antitumoral. Todas las células neoplásicas que forman un tumor pueden ser consideradas supercompetentes porque tienen una ventaja proliferativa respecto a las células normales. Nosotros planteamos conferir una ventaja selectiva añadida a una población de células del tumor para que así pueda competir y reemplazar el resto de células tumorales. Para ello, se han utilizado los genes de resistencia a drogas MDR1 y DHFR. Sin el tratamiento con la droga de selección, no se origina la competición celular y la proporción entre las dos poblaciones tumorales se mantiene constantes a lo largo del tiempo. Sin embargo, la presencia de la droga de selección favorece a la población tumoral modificada que va reemplazando el resto de células tumorales a medida que van muriendo. En este caso, el tratamiento con dicha droga decanta la balanza hacia las células modificadas para ganar la competición celular.

4.1.4. Competencia entre células tumorales y células madre

Los tumores son entidades muy complejas donde conviven células neoplásicas, macrófagos, células endoteliales, linfocitos, fibroblastos asociados a tumor (TAF) y pericitos. Las células que forman el estroma tumoral son reclutadas por las células tumorales y proporcionan los componentes necesarios para la supervivencia del tumor.¹⁴⁸ La proporción de cada tipo de células dentro del tumor varía dependiendo del tipo de cáncer. Así pues, en el cáncer de páncreas más del 50% del tumor está formado por estructuras fibróticas. Se ha demostrado que las células madre mesenquimales (MSC) son reclutadas por el tumor, donde proliferan y se diferencian a células endoteliales, pericitos y fibroblastos asociados a tumor que participan en la formación de estructuras fibrovasculares de soporte.¹⁴⁹

En esta tesis, sugerimos utilizar las MSC como competidoras de las células tumorales. Las células tumorales poseen una tasa proliferativa superior a la de las MSC. Por este motivo, modificamos las MSC con el gen de resistencia a multidrogas MDR1 para aportarles una ventaja proliferativa respecto a las células tumorales en presencia de la droga de selección.

4.2. Los genes de selección

Como ya hemos remarcado anteriormente, la mayor limitación de la terapia génica es la baja eficacia de transferencia génica de los vectores utilizados hasta el momento. La inmunodeficiencia severa combinada ligada al cromosoma X (SCID-XI) es una enfermedad caracterizada por una deficiencia en los linfocitos T.¹⁵⁰ En un estudio clínico realizado por Cavazzana-Calvo y colaboradores se observa una repoblación casi completa del sistema mieloide después de la infusión de una pequeña proporción de precursores hematopoyéticos modificados con el gen terapéutico. Estos resultados clínicos tan esperanzadores se explicaron por una ventaja selectiva *in vivo* de los linfocitos modificados respecto a los causantes de la enfermedad. Esta selección positiva de las células portadoras, asociada a la presencia del gen terapéutico, también se observó en la corrección fenotípica de la inmunodeficiencia severa combinada para la adenosina deaminasa (ADA-SCID).¹⁵¹ En este último caso, las células que habían incorporado la corrección tenían una ventaja selectiva en presencia de dosis bajas de quimioterapia no mieloablativa y acabaron desplazando las células deficientes causantes de la enfermedad.¹⁵¹ Estos resultados sugieren que la aportación de una ventaja selectiva puede ser un método eficiente para aumentar la población de células transducidas *in vivo*. Desafortunadamente, la mayoría de genes terapéuticos no confieren una ventaja selectiva a las células modificadas.

Una primera aproximación para conseguir niveles terapéuticos de células corregidas con genes que no confieran una ventaja selectiva es la transferencia de genes que aporten una ventaja proliferativa selectiva a las células modificadas con el gen terapéutico. La sobreexpresión del gen *homeobox* B4 (HOXB4) ha mostrado una inducción del crecimiento de los precursores hematopoyéticos sin comprometer la diferenciación ni la cantidad de células totales en un modelo de trasplante murino.^{152, 153} Más recientemente, la función de HOXB4 ha sido estudiada en un modelo clínico de trasplante de primates no humanos donde se demostró la expansión y la repoblación de los progenitores hematopoyéticos modificadas después del trasplante. Aún así, esta repoblación fue transitoria y el efecto se fue diluyendo con el tiempo.¹⁵⁴

La aproximación más utilizada hasta el momento para seleccionar las células transducidas *in vivo* es la incorporación de genes de resistencia a drogas.¹⁵⁵ Los genes de selección o genes de resistencia a drogas son genes que confieren resistencia a compuestos dañinos para la célula. En presencia de estos compuestos tóxicos, las células que son resistentes tienen una ventaja

proliferativa respecto a las células no resistentes. Los sistemas de resistencia a drogas se caracterizaron inicialmente en cultivos de células de mamífero como un sistema de selección y amplificación de poblaciones celulares de interés. Estos genes de resistencia han sido y siguen siendo de uso rutinario en los laboratorios de biología celular para seleccionar poblaciones celulares modificadas con un transgén. Dichos genes también han sido ampliamente utilizados en los procesos de protección de la médula ósea a las altas dosis de quimioterapia.¹⁵⁵

4.2.1. La quimioprotección

Desde hace varias décadas, los genes de resistencia a drogas, considerados el mayor obstáculo para tener éxito en el tratamiento contra el cáncer, han sido utilizados como una herramienta de terapia génica contra el cáncer. En este campo, los genes de quimioresistencia MDR1 y DHFR han sido los más utilizados para proteger el sistema hematopoyético de la mielosupresión inducida por las altas dosis de quimioterapia.¹⁵⁶ Estudios realizados en modelos animales han demostrado que es posible conferir resistencia a altas dosis de MTX con sólo un 1% de células madre hematopoyéticas (HSC) portadores del gen DHFR.¹⁵⁷ Esto es debido a una selección positiva de las células modificadas durante el tratamiento.¹⁵⁸ La quimioterapia induce la muerte de las células hematopoyéticas del receptor y las células resistentes del donante acaban repoblando toda la médula ósea (**Figura 10**). Además, se ha demostrado que este enriquecimiento puede ser conseguido con tratamientos de sólo 3 días con MTX.¹⁵⁹ Esta selección positiva también se ha evidenciado en un modelo de perro donde se transplantaron HSC modificados con el gen MDR1 para proteger la médula ósea de los efectos tóxicos de los taxoles.¹⁶⁰

Esta estrategia ha sido utilizada en un ensayo clínico de trasplante de médula ósea donde se ha corroborado el enriquecimiento de los precursores hematopoyéticos modificados después del tratamiento con quimioterapia.¹⁶¹

Estudios realizados por Bunting y colaboradores muestran que las HSC transducidas con el gen MDR1 presentan una ventaja proliferativa incluso en ausencia de la droga de selección.¹⁶² En estudios de repoblación competitiva se ha demostrado que estas células modificadas no sólo tienen la habilidad de repoblar la médula ósea después de ser administradas en un modelo animal irradiado letalmente, sino que también tienen la capacidad de competir y desplazar las células madre no modificadas.¹⁶³ El mecanismo mediante el cual el gen MDR1 promueve la expansión de las HSC *in vivo* no está claro, pero Bunting y colaboradores sugieren que puede estar relacionado con la función de la Pgp y con la redistribución de un sustrato crítico para estas células.¹⁶³

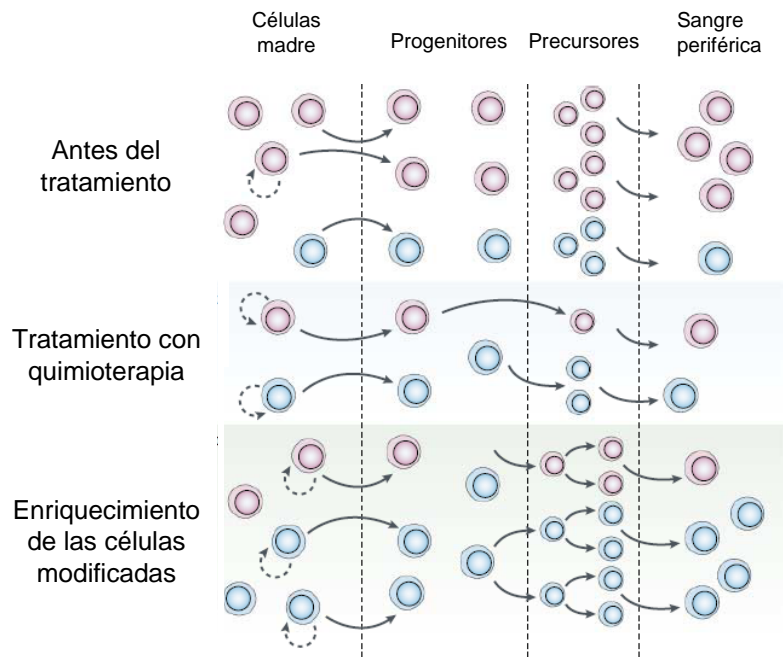


Figura 10. Selección *in vivo* de células madre hematopoyéticas (HSC). La transducción de las células madre con un vector que transporta un gen de resistencia a drogas permite el enriquecimiento de las células madre genéticamente modificadas. Antes del tratamiento, una gran minoría de células contiene y expresa el gen de resistencia a drogas (células azules). El tratamiento con quimioterapia resulta en una muerte de las células no transducidas (células rosas) y una ventaja selectiva de las células resistentes. Después del tratamiento, encontramos un aumento en el número de células madre transducidas que conlleva un aumento en el número de células portadoras del vector en sangre periférica. Este proceso de selección *in vivo* de las HSC mediante la utilización de vectores que expresan el gen MDR1 o el gen DHFR ha sido documentado en varios modelos animales. Adaptado de Sorrentino et al. Nature Reviews 2002.

4.2.2. Selección positiva de células modificadas con genes suicidas

La quimioprotección demuestra la posibilidad de enriquecer *in vivo* una población celular que posee una ventaja selectiva.^{164, 165} Como medida de seguridad se han diseñado vectores que coexpresan el gen MDR1, que confiere una selección positiva en presencia de varias drogas de selección, y un gen suicida, que permite eliminar estas células en el caso que se vuelvan malignas.¹⁶⁶ Siguiendo esta línea, el Dr. Bertino y colaboradores demostraron que una proteína de fusión formada por un gen de resistencia a drogas (DHFR) y un gen suicida (TK) mantenía la actividad de las dos proteínas y que los niveles de expresión de estas proteínas aumentaban después de la administración de trimetrexato (TMTX), un análogo del MTX.¹⁶⁷ La sobreexpresión del gen de la TK fusionado con un gen de selección después de la administración de TMTX sugería la posibilidad de aumentar los niveles de expresión del gen suicida dentro de un tumor.¹⁶⁸

Estos resultados nos llevaron a la idea de modificar una población de células tumorales con una construcción similar a la utilizada por Bertino y colaboradores. Esta población en presencia de MTX tendrá una ventaja selectiva y acabará desplazando las otras células tumorales. Una vez

enriquecido el tumor con la población modificada, la prodroga GCV eliminará las células DHFR/TK y el resto de células tumorales mediante el efecto colateral.

El estudio realizado por Sorrentino y colaboradores sobre el impacto de la expresión del gen MDR1 en las HSC ha sido de gran relevancia en el campo de la selección positiva *in vivo*. Su trabajo ha demostrado que las HSC modificadas con el gen MDR1 se expanden y colonizan la médula ósea de forma competitiva en presencia de una droga de selección.^{155, 164}

Para utilizar esta propiedad del gen MDR1, la segunda parte de esta tesis se basa en modificar una población de células tumorales con el gen MDR1 y el gen de la TK. El tratamiento con docetaxel inducirá la selección positiva de las células modificadas y la posterior administración de GCV permitirá la eliminación completa del tumor gracias al efecto colateral (**Figura 11**).

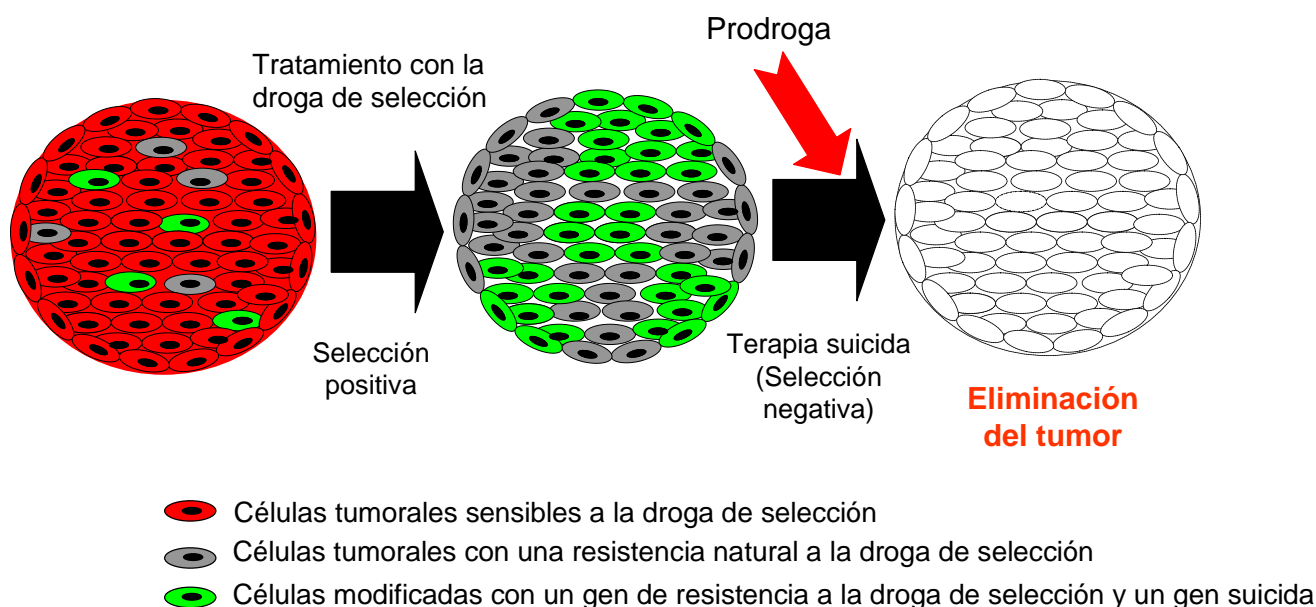


Figura 11. Selección positiva de células modificadas con genes suicidas. Esta estrategia consiste en modificar una pequeña proporción de células del tumor con un gen de resistencia a drogas y con un gen suicida a la vez (marcadas en verde). Antes de tratar un tumor parcialmente sensible a la droga de selección podemos encontrar células sensibles (marcadas en rojo) y células que tienen una resistencia innata o que durante el tratamiento adquirirán resistencia a este compuesto (marcadas en gris). Durante el tratamiento, las células tumorales sensibles mueren y tanto las células resistentes a la droga de selección de forma natural como las células modificadas genéticamente se van enriqueciendo en el tumor. Al final de este proceso de selección positiva, tenemos un tumor completamente resistente formado por las dos poblaciones y donde la proporción de células modificadas con genes suicidas es mucho mayor a la inicial (selección positiva). La aplicación de la prodroga adecuada y el efecto colateral permitirá la eliminación completa del tumor (selección negativa).

5. LAS CÉLULAS MADRE

Una célula madre es una célula indiferenciada que tiene la capacidad de replicarse indefinidamente y diferenciarse, bajo las condiciones apropiadas, a diversos tipos celulares.¹⁶⁹ La división de este tipo celular puede ser simétrica, donde ambas células resultantes conservan el mismo grado de inmadurez que la célula inicial, o asimétrica, dando lugar a una célula igual a su progenitora y otra más diferenciada. Las células madre se pueden clasificar en cuatro categorías dependiendo del potencial de diferenciación:

- **Célula madre totipotente o célula madre embrionaria.** Aquella célula madre capaz de crecer y formar un organismo completo (incluyendo las tres capas embrionarias del endodermo, ectodermo y mesodermo), el linaje germinal, los tejidos que darán el saco vitelino, y los componentes extraembrionarios, como la placenta.
- **Célula madre pluripotente.** Aquella célula madre que sólo puede dar origen a las tres capas embrionarias, así como al linaje germinal y al saco vitelino. No puede formar los componentes extraembrionarios, por lo tanto, no es capaz de formar un organismo completo.
- **Célula madre multipotente.** Aquella célula madre que sólo puede dar origen a los tipos celulares de su propia capa o linaje embrionario de origen.
- **Célula madre unipotente.** Aquella célula madre capaz de dar lugar únicamente a un tipo de célula particular.

Desde un punto de vista ontogénico, las células madre pueden obtenerse de diferentes tejidos:

- **Células madre embrionarias (ESC).** Son células madre totipotentes que se encuentran en la masa celular interna de un embrión pre-implantado en el estado inicial de blastocisto (día 4-5 de gestación en humanos o día 4 en ratones). Las primeras ESC que se obtuvieron se aislaron de la masa celular interna de un blastocisto de ratón^{170, 171} y unos años más tarde se obtuvieron ESC humanas a partir de pre-embriones congelados sobrantes de ciclos de fertilización *in vitro*¹⁷².
- **Células madre adultas.** Son células madre multipotentes presentes en un organismo desarrollado con características de célula madre (autoregeneración y diferenciación) y

cuya función es la regeneración y el mantenimiento de los linajes celulares del tejido en el cual se encuentran. La primera aproximación en la utilización de células madre adultas surge en 1960, cuando el doctor E. Donnall Thomas realizó el primer trasplante de médula ósea con éxito. Él argumentaba que tenía que haber algún tipo celular responsable de la regeneración hematopoyética en los pacientes afectados con leucemia que recibían dicho trasplante.¹⁷³ Años después, se demostraba la existencia de una subpoblación celular en la médula ósea de estos pacientes que era la responsable de la reconstitución hematopoyética después del trasplante. A raíz de estas observaciones y hasta la actualidad, miles de científicos han estudiado en profundidad las células madre, no sólo sanguíneas, sino también de múltiples tejidos adultos, con fines terapéuticos.

Actualmente, se han aislado células madre adultas de prácticamente todos los tejidos del organismo humano adulto¹⁷⁴, entre los que encontramos, médula ósea, tejido adiposo¹⁷⁵, músculo esquelético¹⁷⁶, páncreas, epitelio de la piel, corazón, córnea y sistema nervioso central. Incluso se han obtenido células madre de hígado, médula ósea¹⁷⁷, pulmón¹⁷⁸ o cresta neural¹⁷⁹ de feto humano. Se ha demostrado que, en la mayoría de estos tejidos, estas células realizan una tarea de renovación y mantenimiento de la homeostasis tisular. Un ejemplo es el ya mencionado trasplante de médula ósea, donde las células madre adultas del sistema hematopoyético son capaces de regenerar completamente todas las células sanguíneas y del sistema inmunitario del organismo.

Las células madre adultas, a diferencia de las ESC, son, en general, difíciles de aislar y su capacidad de proliferación *in vitro* es mucho más reducida que la de las ESC.

5.1. Células Madre Mesenquimales (MSC)

Las MSC son un tipo de célula madre adulta que ha demostrado un alto potencial para su uso en biomedicina por su fácil aislamiento, sus propiedades inmunomoduladoras y su tropismo hacia las zonas de inflamación y el parénquima tumoral.¹³⁵ En esta tesis, este tipo de células ha sido utilizado en la estrategia de selección positiva-negativa.

5.1.1. Descubrimiento

En 1976 el grupo del doctor Friedenstein observó que al sembrar médula ósea disgregada en una placa de cultivo y eliminar las células no adheridas a las 4 horas aparecía una población heterogénea de células adherentes. Entre ellas, destacaba un tipo celular de alta adherencia al plástico que tras 2-4 días de inactividad empezaba a dividirse rápidamente, adquiriendo una

aparición homogénea de tipo fibroblástica, y que de manera natural, formaba colonias que producían pequeños depósitos de hueso y cartílago.¹⁸⁰

5.1.2. Caracterización

A pesar del gran trabajo realizado hasta el momento con MSC de médula ósea, en los últimos años, se han aislado y utilizado MSC de otros tejidos, entre los que encontramos tejido adiposo, cordón umbilical¹⁸¹, periostio, sangre¹⁸² y tejido fetal^{177, 178}. Además de las MSC humanas y de ratón, también se ha conseguido aislar y cultivar MSC de otras especies como rata, gato, perro o conejo. Una vez aisladas, las MSC presentan una morfología fibroblástica en cultivo y se caracterizan mediante marcadores de superficie y por su capacidad de diferenciación.

Hasta el momento no se ha encontrado un marcador único de célula madre. Por este motivo, la caracterización fenotípica de las MSC se establece mediante la presencia o no de diversos marcadores de superficie. El Comité de Células Madre de la Sociedad Internacional para la Terapia Celular considera que toda hMSC ha de cumplir una serie de marcadores positivos y negativos¹⁸³ (**Tabla 10**). Existen otra serie de marcadores que pueden variar dependiendo de la especie¹⁸⁴, el origen o el método de aislamiento^{185, 186}.

Marcadores de membrana positivos	Marcadores de membrana negativos
CD73 CD90 CD105	CD14 o CD11b CD34 CD45 CD79 α o CD19 HLA-DR

Tabla 10. Marcadores de superficie principales característicos de las hMSC, según el Comité de Células Madre de la Sociedad Internacional para la Terapia Celular.

Además de la morfología fibroblástica y las características fenotípicas, otro método para caracterizar las MSC es su capacidad para diferenciarse a células de tejido óseo, adiposo o cartilaginoso. En trabajos recientes, se ha demostrado que, bajo las condiciones de cultivo apropiadas, estas células pueden diferenciarse también a miocitos de músculo esquelético¹⁸⁷, cardiomiocitos, células del endotelio vascular¹⁸⁸ y células neurales¹⁸⁹.

5.1.3. MSC de tejido adiposo (ADC)

El tejido adiposo está compuesto por una gran diversidad de tipos celulares, entre los que encontramos las MSC derivadas de tejido adiposo (ADC). Esta nueva fuente de obtención de

MSC fue descrita por primera vez en 2002¹⁹⁰ y ha permitido aislar células madre autólogas de forma repetida, en grandes cantidades y mediante un proceso poco invasivo.

Comparando las ADC con las MSC de otros órganos, no se observan diferencias notables en su morfología, fenotipo inmunológico ni en su capacidad de diferenciación.¹⁹¹ Estas células comparten los marcadores de superficie principales que caracterizan las hMSC y además tienen otros marcadores específicos (**Figura 11**).¹⁹²

Marcadores de membrana positivos		Marcadores de membrana negativos	
CD9	CD105	CD11b	CD133
CD10	CD106	CD14	CD144
CD13	CD146	CD19	HLA-DR
CD29	CD166	CD31	c-kit
CD44	HLA I	CD34	MyD88
CD49	Fibronectina	CD45	STRO-1
CD54	Endomucina	CD79α	Lin
CD55	ASMA	CD80	HLA II
CD59	Vimentina	CD117	
CD73	Colageno-1		
CD90			

Tabla 11. Marcadores de superficie característicos de las hMSC derivadas de tejido adiposo. En negrita se resaltan los marcadores de superficie característicos de todas las hMSC.

El fácil aislamiento y la alta capacidad proliferativa *in vitro* de las hADC en comparación con las hMSC de médula ósea, ha hecho de estas células una herramienta muy útil para la medicina regenerativa, las enfermedades autoinmunes y la terapia contra el cáncer.

5.1.4. MSC fetales

En la gran mayoría de los estudios realizados con MSC se han utilizado MSC adultas. Aún así, se ha descrito la existencia de hMSC fetales y su gran potencial terapéutico.^{193, 194} En concreto, el doctor Moreno y colaboradores aislaron y caracterizaron por primera vez MSC de hígado fetal de conejo que fueron utilizadas para la transferencia génica en útero.¹⁹⁵ Estas células se obtuvieron a partir de la disgregación de hígados fetales de conejos y se denominaron rFL-MSC. Bajo las condiciones de cultivo descritas en las hMSC, las rFL-MSC se diferenciaron a adipocitos, condrocitos y osteocitos.¹⁹⁶ Además, estas células presentaron una alta tasa proliferativa *in vitro*, sobretodo en los primeros pases¹⁹⁶, pero no mostraron capacidad tumorigénica en ratones SCID (ratones deficientes en la producción de linfocitos T y B).

En el último apartado de la presente tesis, las rFL-MSC han sido modificadas con el gen de resistencia a multidrogas MDR1 y el gen suicida FCU para ser utilizadas en nuestra estrategia de selección positiva-negativa.

5.1.5. Utilización terapéutica de las MSC

Las MSC tienen unas propiedades muy atractivas que les permiten ser utilizadas como herramienta terapéutica en un gran número de enfermedades.

5.1.5.1. Propiedades inmunomoduladoras y su aplicación terapéutica

Una de las principales características de las MSC es su baja inmunogenicidad. Las MSC expresan el complejo mayor de histocompatibilidad (MHC) de clase I en su superficie celular (siendo la expresión menor en MSC fetales¹⁹⁷), pero no el MHC de clase II¹⁹⁸, ni las moléculas coestimuladoras CD40, CD80 ni CD86, lo que evita la activación de la señal secundaria. Además, estudios recientes han permitido descubrir la capacidad inmunosupresora de las MSC al inhibir la proliferación de los linfocitos T, la proliferación, diferenciación y la quimiotaxis de las células B, e impedir la maduración y la función de las células dendríticas. Incluso, se ha postulado que las MSC son capaces de activar la proliferación de los linfocitos T reguladores.¹⁹⁹ Estas propiedades inmunoregulatoras de las MSC se han utilizado para inducir tolerancia en un modelo murino²⁰⁰ y para promover el injerto hematopoyético e impedir la reacción del injerto contra el huésped en trasplantes alogénicos. Además, se ha demostrado que la inyección sistémica de ADC de ratón o humanas disminuye significativamente los signos clínicos de enfermedades autoinmunes, como la esclerosis múltiple o la artritis reumatoide²⁰¹, y de la enfermedad de Crohn²⁰² en modelos murinos. Estos resultados se basan en la capacidad de las MSC a educar al sistema inmune a ser más tolerante. Después de la administración *in vivo*, las MSC migran hacia los tejidos inflamados, donde inhiben la secreción de citoquinas proinflamatorias, interactúan con las células del sistema inmune y promueve la supervivencia de las células dañadas.

5.1.5.2. Propiedades reparadoras y su aplicación terapéutica

El proceso de curación de una herida se caracteriza por la presencia de fibroblastos, nuevos vasos sanguíneos generados a partir de angiogénesis, y células inflamatorias en la zona de dañada. Las MSC coordinan este proceso de forma directa proporcionando células hijas diferenciadas que participan activamente en la reparación estructural de la herida (**Figura 12**). La presencia de grupos de células MSC unidas, confirma la capacidad proliferativa de estas células en los lugares de inflamación.¹³⁵ En el proceso de curación de una herida, las MSC también actúan de forma indirecta al secretar una gran cantidad de factores paracrinos que activan la reparación de las células dañadas²⁰³ y modulan el sistema inmune²⁰⁴ (**Figura 12**). Entre los factores solubles secretados por las MSC encontramos factores de crecimiento, como el factor

de crecimiento vascular (VEGF)²⁰⁵ o el factor de crecimiento transformante β 1 (TGF- β 1)²⁰⁶, o interleuquinas como la IL-10²⁰².

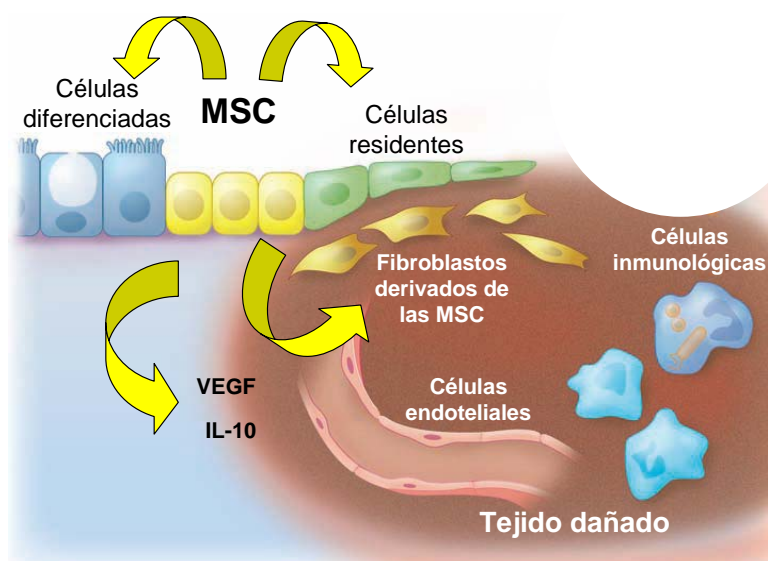


Figura 12. El proceso de curación de una herida implica la coordinación de muchos tipos celulares entre los que encontramos fibroblastos, células endoteliales, plaquetas y células del sistema inmune. Las MSC contribuyen a la regeneración del tejido dañado mediante la generación de células diferenciadas que hacen la función de soporte y mediante la secreción de factores de crecimiento. Adaptado de Stappenbeck et al. Stem Cells 2009.

Estas propiedades reparadoras de las MSC han sido utilizadas clínicamente para curar pacientes con daño en la retina²⁰⁷ o para tratar enfermedades como la osteogenesis imperfecta²⁰⁸ o las enfermedades neurodegenerativas como el Parkinson²⁰⁹ o la Corea de Huntington¹⁹⁴. En modelos preclínicos estas células se han utilizado para regenerar el daño pulmonar²¹⁰, cerebral²¹¹ o cardíaco²¹², o para el tratamiento de enfermedades tales como la glomerulonefritis²¹³, la diabetes²¹⁴ o la enfermedad del injerto contra el huésped²¹⁵.

5.1.5.3. Tropismo hacia las zonas de inflamación y su aplicación terapéutica

Como se ha explicado en el apartado anterior, en el proceso de regeneración de una herida se secretan una gran cantidad de mediadores inflamatorios entre los que encontramos diversos factores de crecimiento como el EGF, el FGF, el PDGF, el TGF- β y el VEGF o interleuquinas como la IL-1 y la IL-6 y el TNF- α ²¹⁶. En los últimos años, se ha demostrado que este ambiente proinflamatorio induce el reclutamiento de las MSC inyectadas de forma sistémica.²⁰³

El proceso de formación tumoral, al igual que la regeneración de una herida, se caracteriza por la presencia de un ambiente proinflamatorio.²¹⁷ Estudios recientes demuestran que las señales inflamatorias secretadas por el tumor también pueden atraer a las MSC administradas

sistémicamente de una forma similar al reclutamiento de los leucocitos hacia las zonas de inflamación. La radiación es capaz de aumentar la expresión de estos mediadores inflamatorios, incrementado así el reclutamiento de las MSC por el tumor.²¹⁸ Una vez alcanzan el tumor, estas células proliferan y se integran en el estroma tumoral, diferenciándose a células endoteliales, pericitos y fibroblastos que participan en la formación de estructuras fibrovasculares de soporte.²¹⁹ Recientemente, se ha sugerido que las MSC también pueden dar lugar a los precursores de los fibroblastos asociados a tumor.¹⁴⁹

El tropismo de las MSC hacia las lesiones tumorales ha sido utilizado por numerosos grupos para dirigir quimiosensibilizadores²²⁰, metaloproteasas²²¹, inductores de la respuesta inmune²²², adenovirus oncolíticos²²³ o genes suicidas^{93, 94} hacia los tumores.

5.1.6. Estrategia de selección positiva-negativa con MSC

El grupo del doctor Altaner ha demostrado la eficacia terapéutica de la administración sistémica de MSC de tejido adiposo cargadas con el gen suicida FCU en diversos modelos tumorales implantados en ratones.^{93, 94, 136} Para aumentar esta eficacia terapéutica nos planteamos enriquecer en el tumor una población de MSC modificada con el gen de resistencia a multidrogas MDR y el gen FCU mediante el tratamiento con una droga de selección. En presencia de dicha droga, gran parte de las células tumorales mueren por el efecto tóxico y el estroma tumoral, principalmente tejido conectivo y fibroblastos, coloniza las áreas necrosadas produciendo una cicatriz. El daño celular inducido por la droga de selección, además de disminuir la viabilidad de las células tumorales, también activaría la replicación y los mecanismos de reparación mediados por las MSC. En presencia de la droga de selección, las MSC modificadas con el gen MDR adquirirían una ventaja selectiva sobre las células tumorales que les permitiría colonizar el tumor. Después de esta fase de enriquecimiento, la administración de la prodroga adecuada y el efecto colateral permitiría la eliminación completa del tumor.

OBJETIVOS

La terapia génica suicida ha mostrado una gran eficacia antitumoral en modelos preclínicos. A pesar de estos resultados esperanzadores, el efecto terapéutico de esta estrategia en la clínica ha sido muy reducido. Existen dos limitaciones principales que explicarían estos resultados. En primer lugar, la baja eficiencia de transducción de los vectores transportadores de genes suicidas utilizados en la clínica, y en segundo lugar, la necesidad de administrar localmente dichos vectores por motivos de seguridad. Con tal de aumentar el número de células transducidas con genes suicidas en el tumor, en esta tesis doctoral proponemos una estrategia terapéutica novedosa basada en el enriquecimiento de dichas células.

Objetivo general

- Uso de los genes de resistencia a drogas, en combinación con drogas de selección, para enriquecer las células modificadas con genes suicidas en el tumor y mejorar la eficacia de la terapia génica suicida.

Objetivo específicos

- Modificar la línea de cáncer colorrectal HCT116 y la línea de adenocarcinoma pancreático NP18 con los genes de selección DHFR/TK y MDR/TK, respectivamente, para conseguir la selección positiva de las células modificadas en cultivos mixtos con células tumorales parentales después del tratamiento con la droga de selección.
- Aplicar la terapia génica suicida después de una fase de selección positiva para conseguir la mejora de su eficacia terapéutica.
- Extraer células madre mesenquimales de grasa de ratón y determinar la selección positiva de éstas en presencia de células tumorales NP18 después del tratamiento con docetaxel.
- Modificar las células madre mesenquimales de hígado fetal de conejo con los genes de selección MDR/FCU para conseguir la selección positiva-negativa *in vitro* y el enriquecimiento *in vivo* de dichas células después del tratamiento con la droga de selección.

RESULTADOS

Los resultados obtenidos en la presente tesis doctoral se presentan en forma de dos artículos publicados como primer autor en las revistas *Human Gene Therapy* y *Molecular Cancer Therapeutics*. En estos dos artículos se evalúa la eficacia de la estrategia de selección positiva-negativa en células tumorales.

Antitumor therapy based on cellular competition
J Martinez-Quintanilla, M Cascallo, C Fillat and R Alemany
Human Gene Therapy 20:728–738 (July 2009)

La terapia génica suicida proporciona una herramienta eficaz para el tratamiento del cáncer. En concreto, el gen suicida TK en combinación con la prodroga GCV ha demostrado una gran eficacia en modelos animales. Existen numerosos grupos trabajando en la mejora del sistema TK/GCV. Estos estudios se basan fundamentalmente en incrementar la llegada del suicida TK a las células tumorales con vectores más eficientes y en aumentar el efecto colateral del sistema. A pesar de los resultados esperanzadores de la preclínica, la baja transducción de las células tumorales con genes suicidas dificulta la eficacia de esta terapia en la clínica.

Para compensar la baja transferencia génica de las células tumorales *in vivo*, en este artículo proponemos seleccionar las células modificadas con el gen suicida TK en el tumor. Para ello, se utilizó el gen DHFR, que confiere resistencia al MTX. Dicha droga, induciría la muerte de las células tumorales parentales y permitiría la selección positiva de las células modificadas. Una vez enriquecido el tumor con las células que expresan el gen suicida, la aplicación del GCV eliminaría las células modificadas y las células tumorales adyacentes mediante el efecto colateral.

La prueba de concepto de la selección positiva-negativa se realizó en la línea tumoral de cáncer colorrectal humano HCT116 modificada con un plásmido episomal portador del gen de fusión DHFR/TK. Dicho plásmido aseguraba la propagación de los genes de selección a las células hijas. Para poder diferenciar las dos poblaciones celulares, las células modificadas se marcaron con el gen de la GFP y las células parentales HCT116 con el gen de la RFP.

El gen de selección DHFR permitió enriquecer las células modificadas de un 0.1% inicial a un 90% en cultivos mixtos con células HCT116 parentales después de 35 días de selección con MTX. Los experimentos *in vivo* mostraron la capacidad de aumentar la proporción de células modificadas en el tumor de un 1% inicial a un 15% después de 24 días de tratamiento con la droga de selección MTX. A partir de un 1% inicial de células HCT116-DHFR/TK este enriquecimiento permitió disminuir el 50% del tamaño tumoral después de la administración sistémica de GCV. En tumores con un 6% inicial de células modificadas la estrategia de selección positiva-negativa mostró una regresión tumoral significativa respecto a los controles. En ambos casos este efecto terapéutico fue superior al obtenido con la terapia génica suicida *per se*.

En este artículo proporcionamos la prueba de concepto del uso del gen de resistencia a drogas DHFR como gen de selección de las células tumorales modificadas con el gen suicida TK en presencia de MTX. Este enriquecimiento, seguido de la administración de GCV, aumenta la eficacia antitumoral de la terapia génica suicida *per se*. Aún así, la ausencia de remisiones completas plantea el uso de otros genes de selección, como el gen MDR1, que confiere resistencia a drogas más potentes.

Antitumor Therapy Based on Cellular Competition

Jordi Martinez-Quintanilla,¹ Manel Cascallo,¹ Cristina Fillat,² and Ramon Alemany¹

Abstract

A major obstacle for the efficacy of cancer gene therapy is the need to transduce a high proportion of tumor cells with genes that directly or indirectly cause their death. During the formation of certain organs, cells compete among themselves to colonize the whole tissue. We reasoned that cell competition could be used to increase the proportion of cells that become transfected in a tumor. For this, a transgene that provides a selective advantage to the transfected cells should be used. If the same gene conferred a suicide mechanism the tumor could be eradicated after a period of selection. Bystander effect of transfected cells over neighboring non-modified cells may eliminate tumors even with incomplete replacement of tumor cells. To test this strategy a competitive advantage was provided to colon cancer cells, using a gene encoding a fusion protein of dihydrofolate reductase (DHFR) and thymidine kinase (TK). DHFR confers resistance to methotrexate (MTX) and TK confers sensitivity to ganciclovir (GCV). Modified cells were also transduced with green fluorescent protein and parental cells with red fluorescent protein. *In vitro* and *in vivo* experiments were performed, using various proportions of modified cells and applying positive selection with MTX followed by negative selection with GCV. *In vitro*, cell competition was evident. Under MTX treatment, tumor cells transfected with the DHFR–TK fusion gene efficiently replaced the parental cells (from 0.1 to 90% in 35 days). After this positive selection period, negative selection with GCV eliminated the transfected cells. *In vivo*, positive selection was also achieved and resulted in a statistically significant therapeutic effect.

Introduction

IN 1980 MARTIN CLINE transfected the bone marrow of two B-thalassemic children *ex vivo* with a plasmid expressing herpes simplex virus thymidine kinase (HSV-TK) and β -globin (Mercola *et al.*, 1980). TK phosphorylates thymidine to TMP and it can be used for positive selection when thymidine is added to the medium and the *de novo* synthesis of TMP is blocked with the antifolate drug methotrexate (MTX) (Campione-Piccardo *et al.*, 1979). In this way, the HSV-TK gene was used as a positive selection marker of transfected cells treated with MTX (Mercola *et al.*, 1980). However, efficient positive selection with HSV-TK required defined medium and lack of endogenous TK in nontransfected cells and therefore its use has remained restricted to *in vitro* selection protocols. More than a decade later, the HSV-TK gene was transduced into tumor cells with retroviral vectors in order to achieve the negative selection of the transduced cells in the presence of the prodrug ganciclovir (GCV) (Culver *et al.*, 1992). This and many later gene therapy clinical trials have pointed out the need to amplify the proportion of tumor cells affected by gene therapy (Rainov, 2000; Rainov and Ren, 2003; Immonen *et al.*, 2004). The

use of HSV-TK in both directions, for positive and negative selection of transfected cells, prompted us to test a new therapy regimen in which the negative selection is performed after a period of positive selection.

It is well known that during the formation of certain organs, cells compete among themselves to colonize the whole tissue (Moreno *et al.*, 2002; Moreno and Basler, 2004; Diaz and Moreno, 2005). During chemotherapy treatment there is selective pressure inside the tumor that results in expansion of resistant cells (Fig. 1A) (de Anta *et al.*, 2006). The search for genes that can be selected *in vivo* has been a goal in chemoprotective gene therapy. Chemoprotection seeks to protect bone marrow and other organs from adverse effects of high-dose chemotherapy (Banerjee *et al.*, 1994; Licht *et al.*, 1997). The genes most commonly used have been dihydrofolate reductase (DHFR) (Bertino *et al.*, 1996) and multidrug resistance (MDR1) genes (Bosch and Croop, 1996). DHFR is the cellular enzyme that regenerates the tetrafolate used during the conversion of dUMP to TMP in the synthesis of nucleotides. DHFR can be inhibited by MTX, which results in the blockade of the synthesis of purines, thymidylate, and certain amino acids. MTX is used to treat acute lymphoblastic leukemia and

¹Gene and Viral Therapy Group, IDIBELL-Catalan Institute of Oncology (ICO), L'Hospitalet de Llobregat, 08907 Barcelona, Spain.

²Centre de Regulació Genòmica, UPF, Parc de Recerca Biomèdica de Barcelona and Centro de Investigación Biomédica en Red de Enfermedades Raras (CIBERER-ISCIII), 08003 Barcelona, Spain.

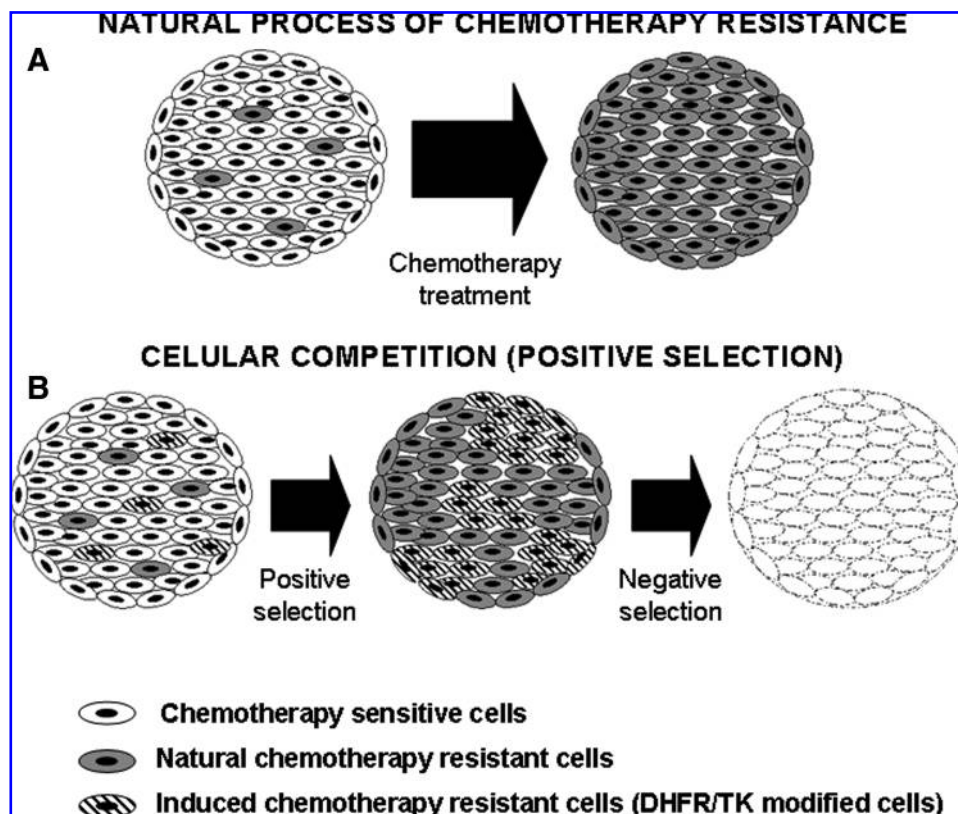


FIG. 1. Natural process of chemotherapy resistance compared with the proposed strategy of cell competition. (A) Scheme of the natural process of chemotherapy resistance. Chemotherapy-sensitive cells are represented in white and cells that will become chemotherapy resistant in gray. During chemotherapy, endogenous or naturally resistant cells are selected and sensitive cells are eliminated. Finally, all the tumors become chemotherapy resistant. (B) The process of competition suicide or enrichment suicide. Some cells are gene modified with chemotherapy resistance and suicide genes (hatched cells). During chemotherapy, naturally resistant cells and gene-modified cells are enriched (positive selection). In the presence of the bystander effect, resulting tumors can then be eliminated by treatment with the suicide-inducing prodrug (negative selection).

lymphoma, but it is highly myelosuppressive. DHFR mutants with highly reduced binding affinity for MTX, such as the Phe22–Ser31 double mutant DHFR (dmDHFR) (Ercikan-Abali *et al.*, 1996; Sauerbrey *et al.*, 1999), can protect bone marrow from MTX-induced myelosuppression and have been used to positively select transfected hematopoietic cells *in vivo* (Meisel *et al.*, 2003). As an initial approach toward positive selection of transfected cancer cells *in vivo* we decided to use this dmDHFR encoded in an episomal plasmid. This mechanism maintains protein expression during transfected cell propagation. In the context of negative selection with HSV-TK and GCV, the use of DHFR has an additional advantage. Coexpression of TK and DHFR potentiates the resistance to MTX because they contribute to bypass the block of thymidylate synthesis (Mineishi *et al.*, 1997). Furthermore, the group lead by J. Bertino has demonstrated that a fusion protein of DHFR and HSV-TK preserves the activity of both proteins and is overexpressed in the presence of MTX (Mayer-Kuckuk *et al.*, 2002). This upregulation of HSV-TK expression by means of fusion to DHFR and administration of MTX *in vivo* has been proposed as a way to increase the expression level of TK in tumor cells (Mayer-Kuckuk *et al.*, 2003). We have therefore used a similar construct fusing dmDHFR and HSV-TK in order to enrich the transfected cell population of a

tumor by means of MTX administration. Transfected cell enrichment should be associated with an increased GCV therapeutic effect, and in a model with bystander effect, the enrichment of modified cells could eliminate tumors after suicide-inducing prodrug treatment (a scheme is presented in Fig. 1B). In the absence of a bystander effect natural drug-resistant cells would survive after GCV treatment, and therefore the bystander effect is important to eliminate all tumor cells completely. A similar enrichment–suicide approach has been proposed, using the *FCU1* gene and *N*-(phosphonacetyl)-*L*-aspartate (PALA)/5-fluorocytosine (5-FC) selection (Unger *et al.*, 2007).

Materials and Methods

Cell culture and reagents

The human colon cancer cell line HCT116 was obtained from the American Type Culture Collection (ATCC, Manassas, VA) and grown in Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) containing 5% fetal bovine serum (FBS) and 1% penicillin–streptomycin (P/S). Cells were maintained at 37.0°C and 5% CO₂ in a humidified atmosphere and were mycoplasma negative. Methotrexate (MTX) was provided by Wyeth Pharma (Madrid, Spain). A 54 mM stock solution was

prepared in phosphate-buffered saline (PBS) and dilutions were made in PBS. Ganciclovir (GCV) was provided by Roche Diagnostics (Mannheim, Germany). A stock solution at 100 mg/ml was prepared in PBS and dilutions were made in PBS.

Plasmid construction

The green fluorescent protein (GFP) gene from pEPI-1 (Jenke *et al.*, 2002) was replaced with a TK-EGFP fusion gene from plasmid pTK-EGFP (Cascante *et al.*, 2005). The resulting plasmid, pEPI-TKGFP, contains the TK-GFP fusion gene driven by the cytomegalovirus (CMV) promoter. It also contains a chromosomal scaffold/matrix-attached region and the simian virus 40 (SV40) origin of replication to achieve episomal propagation in eukaryotic cells (Jenke *et al.*, 2002). We synthesized a double mutant Phe22-Ser31 DHFR gene (Sauerbrey *et al.*, 1999) using 24 overlapping oligonucleotides spanning the 564 base pairs of the DHFR cDNA plus appropriate restriction sites at both ends and cloned it into pBluescript to obtain pBS-dmDHFR. The GFP gene from pEPI-TKGFP was replaced with the dmDHFR gene to obtain pEPI-DHFR/TK.

Generation of stable HCT116DHFR/TK-GFP and HCT116-RFP clones

HCT116 cells were seeded in a 6-well plate and transfected 24 hr later with 3 μ g of pEPI-DHFR/TK plasmid with FuGENE 6 transfection reagent (Roche Diagnostics) according to manufacturer protocols. HCT116DHFR/TK stable clones were selected with 0.625 μ M MTX for 24 days. We used red fluorescent protein (RFP) and green fluorescent protein (GFP) as marker genes of the parental and transfected cells, respectively. The packaging cell lines PA317DsRED and PA317DsGFP (kindly provided by F. Larcher, Centro de Investigaciones Energéticas, Medioambientales y Tecnológicas, CIEMAT, Madrid, Spain) were used to produce Moloney leukemia vector RED2 and Moloney leukemia vector GFP, respectively. Cells were grown in DMEM-10% FBS and medium was replaced when cells reached 70–80% of confluence. PA317DsRED and PA317DsGFP conditioned medium was used to infect HCT116 or HCT116DHFR/TK, respectively, in the presence of Polybrene (8 μ g/ml; Sigma-Aldrich, St. Louis) and DMEM-5% FBS. Twelve hours after infection, medium was replaced with fresh medium and cells were seeded in a 96-well plate at a confluence of two or three cells per well. After incubation for 21 days and under fluorescence microscopy we obtained HCT116-RFP and HCT116DHFR/TK-GFP clones.

In vitro MTX and GCV sensitivity of HCT116DHFR/TK-GFP and HCT116 RFP cells

HCT116-RFP and HCT116DHFR/TK-GFP cells were plated in 96-well plates (2.5×10^4 cells per well). Two days later, cells were incubated with various concentrations of MTX or GCV. Cell viability was measured by bicinchoninic acid (BCA) protein assay (Pierce Biotechnology/Thermo Fisher Scientific, Rockford, IL) 12 days after treatment. The percentage of cell viability was defined by the equation $T/NT \times 100$, where T is the viability of treated cells and NT is the viability of non-treated cells.

In vitro positive and negative selection

A mixture of 0.1% HCT116DHFR/TK-GFP cells and 99.9% parental HCT116-RFP cells was seeded in quadruplicate in 3.5-cm plates (1.3×10^6 cells per plate). Two days later, cells were incubated with 0.625 μ M MTX. The selection medium was replaced three times every week. Images ($\times 100$) were taken with a confocal microscope (spectral confocal TCS-SL; Leica Microsystems, Wetzlar, Germany) on various days after treatment with MTX. To quantify the amount of GFP and RFP cells, cell monolayers were harvested on various days after MTX administration and cells were fixed with 4% paraformaldehyde (PFA) in PBS overnight. After washing with PBS, cells were resuspended at 10^6 cells/ml PBS and at least 50,000 cells were analyzed by flow cytometry (FACSCalibur system; BD Biosciences, San Jose, CA) using 488- and 633-nm lasers and CellQuest Pro software.

For negative selection, after *in vitro* MTX treatment, cells were incubated with GCV (10 μ g/ml) for 20 days (MTX was also maintained). Confocal microscopy images ($\times 100$) were taken on various days during the treatment. To quantify the degree of negative selection, cells were harvested and analyzed by flow cytometry according to the previously described protocol.

In vivo positive selection

To allow for positive selection, subcutaneous xenografts were established in the flanks of 4- to 8-week-old male BALB/c *nu/nu* mice by inoculation of a mixture of 3.5×10^6 cells consisting of 1% HCT116DHFR/TK-GFP cells and 99% parental HCT116-RFP cells. Animals were kept and manipulated in accordance with recommendations of the Federation of European Laboratory Animal Science Associations for the proper use of laboratory animals. Fifteen days later, animals received MTX (9 mg/kg) or PBS intraperitoneally three times every week. On the indicated day of treatment (day 0, 10, 17, 24, or 31) animals were killed and tumors were excised and fixed with 4% paraformaldehyde (PFA) in PBS overnight. After washing with PBS, tumors were incubated with sucrose 5% in PBS (2 hr) and sucrose 30% in PBS (overnight). Tumors were then cryopreserved with O.C.T. medium and cryosectioned at 5 μ m with a cryotome (Shandon cryotome cryostat; Global Medical Instrumentation, Ramsey, MN). Sections were mounted and GFP and RFP expression was viewed with a confocal microscope. To compensate for heterogeneity within the tumors, three images ($\times 400$) were taken from the same section. Quantification was performed by a blinded observer and three fields of each section were counted.

In vivo bystander effect of HCT116DHFR/TK-GFP cells with GCV

Subcutaneous xenografts were established in the flanks of 4- to 8-week-old male BALB/c *nu/nu* mice by inoculation of 3.5×10^6 cells consisting of 100% HCT116-RFP cells, 100% HCT116DHFR/TK-GFP cells, or a mixture of 50% HCT116DHFR/TK-GFP cells and 50% of HCT116-RFP cells. Once tumors reached 100–170 mm³, animals started GCV treatment (75 mg/kg, administered intraperitoneally daily for 14 days) ($n = 6-8$). Tumors were measured two times weekly and tumor volume was calculated according to the equation $V \text{ (mm}^3\text{)} = \pi/6 \times W \times L^2$, where L and W are length and width

of the tumor, respectively. Percentage growth was defined by the equation $[(V - V_0)/V_0] \times 100$, where V_0 is the tumor volume on day 0 after GCV treatment. The significance of differences in tumor growth rate between treatment groups was assessed by the Student unpaired *t* test.

In vivo positive and negative selection

The positive and negative selection strategy was performed using two different proportions of HCT116DHFR/TK-GFP cells. In one experimental setting subcutaneous xenografts were established in the flanks of 4- to 8-week-old male BALB/c *nu/nu* mice by inoculation of a mixture of 3.5×10^6 cells consisting of 1% HCT116DHFR/TK-GFP cells and 99% parental HCT116-RFP cells. One day later, animals received MTX (9 mg/kg) or PBS intraperitoneally three times per week. Once tumors reached 300 mm³, animals finished MTX treatment (positive selection) and were treated intraperitoneally with GCV (50 mg/kg) daily for 14 days (negative selection) ($n = 9$). In a different experimental setting subcutaneous xenografts were established in the flanks of 4- to 8-week-old male BALB/c *nu/nu* mice by inoculation of a mixture of 3.5×10^6 cells consisting of 6% HCT116DHFR/TK-GFP cells with 94% parental HCT116-RFP cells. One day later, animals were randomly distributed into four groups (MTX+PBS, MTX+GCV, PBS+PBS, and PBS+GCV). The positive selection phase (treatment with MTX or PBS) was performed from 1 day after tumor implantation until tumors reached 100–170 mm³. When we finished positive selection we began intraperitoneal GCV treatment (75 mg/kg) daily for 14 days ($n = 9$). Tumors were measured two times weekly.

Results

In vitro MTX and GCV sensibility of HCT116DHFR/TK-GFP and HCT116-RFP cells

We constructed a DHFR/TK fusion gene to allow for positive-negative selection of transfected cells. As a plasmid backbone we used pEPI-1, a plasmid that contains a eukaryotic origin of replication and chromosomal elements for replication and segregation. The resulting plasmid, pEPI-DHFR/TK, was transfected into HCT116 colon carcinoma cells, which were then selected for a population of MTX-resistant cells. After MTX selection, resistant cells were infected with green fluorescent protein recombinant retrovirus, and an HCT116DHFR/TK-GFP clone was selected. In parallel, parental HCT116 cells were infected with a red fluorescent protein recombinant retrovirus and a parental HCT116-RFP clone was selected. We determined the *in vitro* sensitivity to MTX and GCV of the selected HCT116DHFR/TK-GFP and HCT116-RFP clones. The MTX median inhibitory concentration (IC₅₀) for HCT116DHFR/TK-GFP cells was about 5 μM whereas for the parental HCT116-RFP cells the MTX IC₅₀ was less than 0.625 μM (Fig. 2A). These results indicate that under MTX, HCT116DHFR/TK-GFP cells have a proliferative advantage with respect to HCT116-RFP cells (positive selection). On the other hand, HCT116DHFR/TK-GFP cells were sensitive to GCV doses as low as 0.625 μg/ml (Fig. 2B). These results indicate that HCT116DHFR/TK-GFP cells could be used for positive selection with MTX and negative selection with GCV.

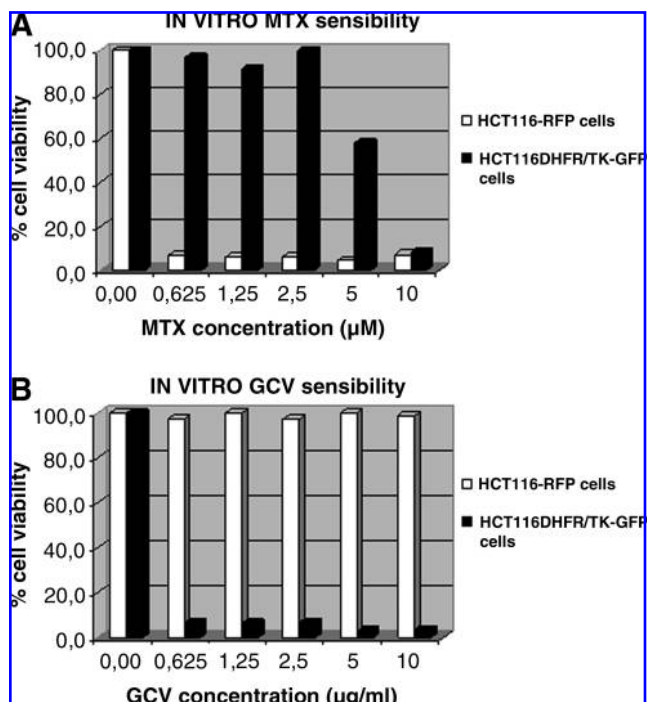


FIG. 2. HCT116DHFR/TK cells are resistant to MTX and sensitive to GCV *in vitro*. HCT116-RFP cells (open columns) and HCT116DHFR/TK-GFP cells (solid columns) were plated in 96-well plates. Two days later, cells were incubated with various concentrations of (A) MTX or (B) GCV. Cell viability was measured by BCA protein assay 12 days after treatment. The percentage of cell viability was quantified as $T/NT \times 100$, where T is the viability of treated cells and NT is the viability of nontreated cells.

In vitro positive selection with MTX

Next we determined whether a small proportion of HCT116DHFR/TK-GFP cells could compete out parental HCT116-RFP cells under MTX treatment. After 15 days of MTX treatment, 0.1% of HCT116DHFR/TK-GFP cells overgrew HCT116-RFP cells. Without MTX treatment the transfected cells did not show any advantage over parental cells (Fig. 3A). To verify the results of positive selection quantitatively, we analyzed the samples by flow cytometry and the results demonstrated that under MTX treatment, the proportion of HCT116DHFR/TK-GFP cells increased from 0.1 to 90% in 35 days (Fig. 3B).

In vitro negative selection with GCV

We then examined how positive selection with MTX followed by negative selection with GCV could help to eradicate all the cells in a monolayer culture *in vitro*. After 15 days of MTX positive selection HCT116DHFR/TK-GFP cells were eliminated with GCV but nontransfected HCT116-RFP cells survived, indicating a poor bystander effect. All the areas corresponding to HCT116DHFR/TK-GFP cells were cleared from the cultures, but the adjacent areas of parental cells remained unaltered (Fig. 4A). To verify the results of negative selection quantitatively, we analyzed the samples by flow cytometry and the results confirm that on GCV addition only transfected cells were eliminated (Fig. 4B).

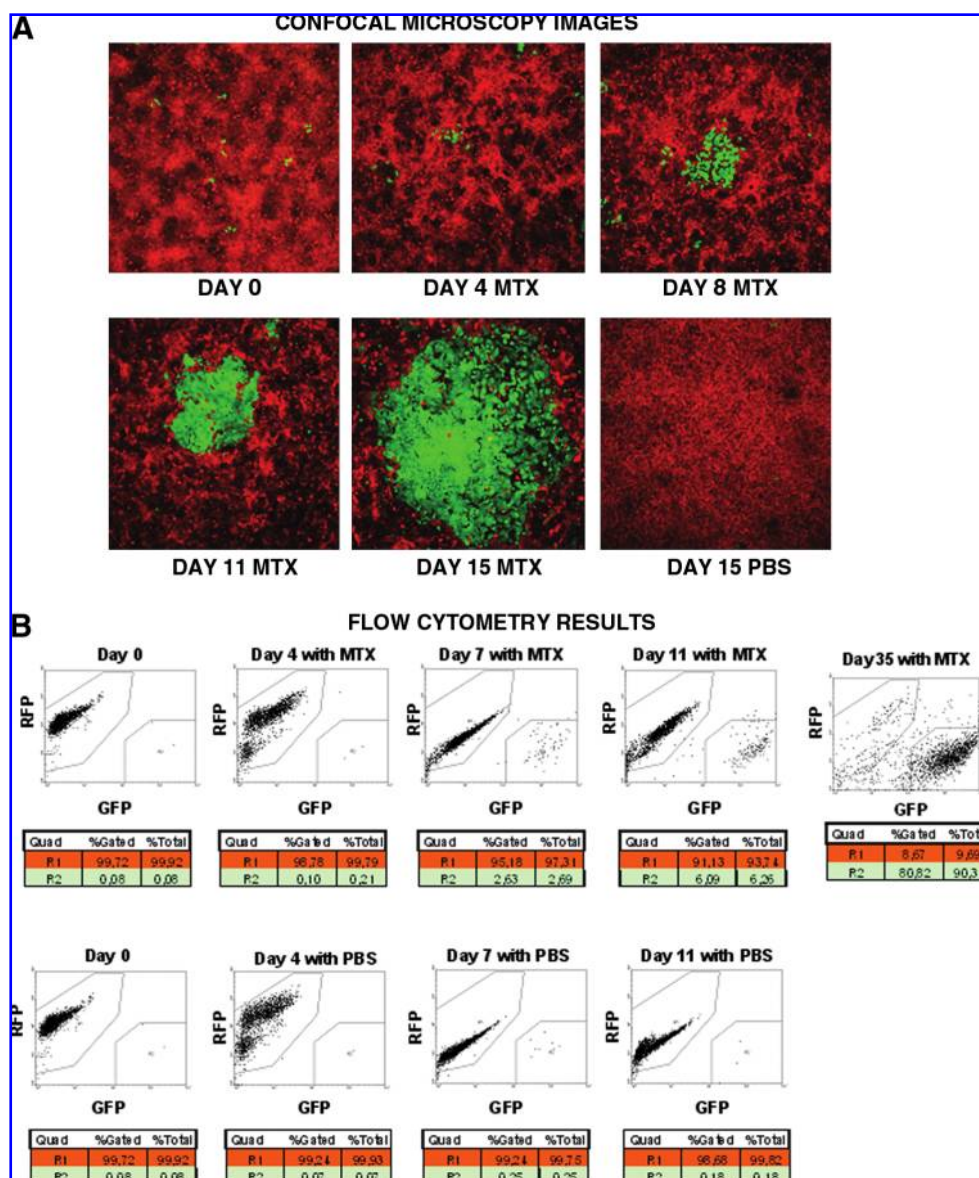


FIG. 3. DHFR/TK-transfected cells (green) outcompete parental cells (red) *in vitro*. (A) HCT116DHFR/TK cells were labeled with GFP and HCT116 cells with RFP. A mixture of 0.1% GFP cells with 99.9% RFP cells was seeded in 3.5-cm-diameter plates (1.3×10^6 cells per plate). Two days later, at confluency, cells were incubated with or without MTX ($0.625 \mu\text{M}$). Confocal microscopy images (original magnification, $\times 100$) were taken on various days of treatment (days 0, 4, 8, 11, and 15). (B) To quantify the level of positive selection, cells were harvested on days 0, 4, 7, 11, and 35 of treatment and analyzed by flow cytometry. Under each graph the population percentage is indicated: R1, RFP cells; R2, GFP cells. Color images available online at www.liebertonline.com/hum.

In vivo positive selection with MTX

We determined whether a small proportion of HCT116DHFR/TK-GFP cells could replace parental HCT116 cells *in vivo* under MTX treatment. In preliminary experiments, mice with HCT116 implanted tumors treated with MTX showed only partial reduction of tumor size (15% on day 17). This suggested that MTX treatment was less efficient *in vivo* than *in vitro* (data not shown). We decided to use a higher transfected cell proportion for *in vivo* positive selection (1%) than for *in vitro* selection (0.1%). Thus we established subcutaneous tumors in mice by injecting them with a mix-

ture of transfected and nontransfected cells. Animals were given MTX or PBS and were killed on various days throughout the treatment. Regarding MTX toxicity, weight loss did not exceed 10% of body weight, no mice died, and there were no gross signs of toxicity. To measure the relative amounts of parental and transfected cells in tumors treated with MTX, tumor sections were analyzed by fluorescence microscopy. GFP⁺ transfected cells distributed heterogeneously, and different microscopy fields throughout the sections ($\times 100$ and $\times 400$) were used to estimate the percentage of GFP and RFP cells. The proportion of transfected tumor cells increased on MTX treatment. Figure 5A shows a classification

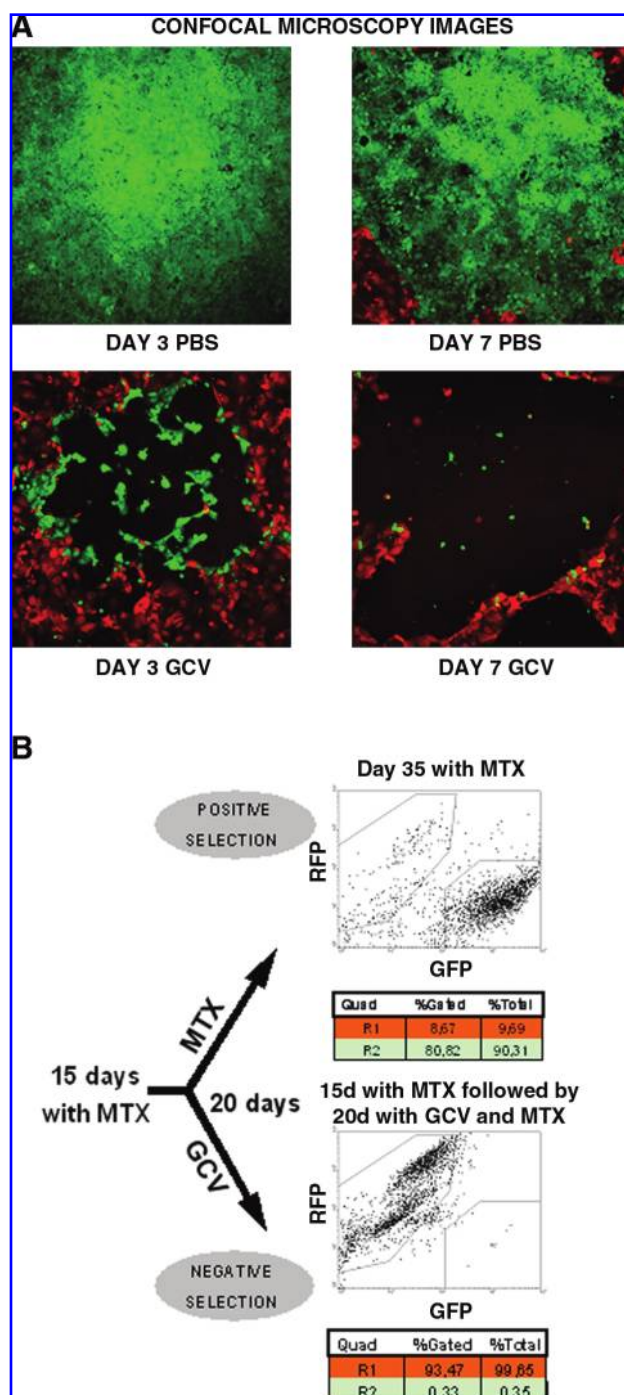


FIG. 4. HCT116DHFR/TK-GFP cells (green) are eliminated *in vitro* with GCV. (A) After 15 days of positive selection with MTX (as in Fig. 3), cells were incubated with or without GCV (10 μ g/ml). Confocal microscopy images (original magnification, \times 100) were taken on various days of GCV treatment (days 3 and 7). (B) To quantify the level of negative selection, after 15 days of positive selection with MTX, cells were incubated in the presence or absence of GCV (10 μ g/ml) for 20 days. On day 35, cells were harvested and analyzed by flow cytometry. Under each graph the population percentage is indicated (R1, RFP cells; R2, GFP cells). Color images available online at www.liebertonline.com/hum.

of tumors in three groups according to the estimated proportion of transfected cells. Without MTX (Fig. 5A, PBS, open columns) all tumors had <5% of transfected cells on day 31 of treatment. In contrast, on MTX selection (Fig. 5A, MTX, solid columns) more than 40% of tumors had >15% transfected cells at this date. Figure 5B shows three images (\times 400) of a representative tumor from the MTX group compared with one from the PBS group. A clear enrichment of GFP⁺ transfected cells is observed.

In vivo bystander effect of HCT116DHFR/TK-GFP cells with GCV

To assess whether HCT116DHFR/TK-GFP cells induced a bystander effect *in vivo*, mice with implanted tumors containing 100% HCT116-RFP cells, 100% HCT116DHFR/TK-GFP cells, or a mixture of 50% of each were treated with GCV. Regarding GCV toxicity, weight loss did not exceed 10% of body weight, no mice died, and there were no gross signs of toxicity. This experiment showed that after GCV treatment tumors containing 100% genetically modified cells were eliminated, whereas tumors with parental cells or with only 50% modified cells continued growing (Fig. 6). These results confirmed that although HCT116DHFR/TK-GFP cells were sensitive to GCV *in vivo*, tumors with 50% modified cells were not eliminated because of the absence of a bystander effect in this tumor model.

In vivo negative selection with GCV

Despite the absence of a bystander effect in this tumor model we determined whether the positive and negative selection strategy was effective *in vivo*. When tumors containing 1% HCT116DHFR/TK-GFP cells, under positive selection (MTX treatment), reached 300 mm³ we started the negative selection phase (GCV treatment). The mean growth of tumors treated with GCV after positive selection was 50% lower than that of the control group on day 14. However, growth differences were not statistically significant (Fig. 7A). When sections of the tumors were observed under fluorescence, no GFP⁺ cells were present throughout the tumors of GCV-treated mice (data not shown). This meant that, starting with an initial proportion of 1% HCT116DHFR/TK-GFP cells, although positive selection increased the proportion of transfected cells in tumors (as demonstrated in Fig. 5) and the transfected cells were sensitive to GCV, the proportion of transfected to nontransfected cells was not high enough to abrogate tumor growth on GCV treatment.

When the initial proportion of HCT116DHFR/TK-GFP cells was 6%, negative selection was initiated when tumors were palpable, and animals received a higher dose of GCV (75 mg/kg daily for 14 days). Tumors treated with GCV (negative selection) but without positive selection with MTX did not show any difference from control groups, indicating that 6% HCT116DHFR/TK-GFP cells in a tumor was not enough to obtain a therapeutic effect with GCV. However, the mean growth of tumors treated first with MTX (positive selection) and later with GCV (negative selection) showed statistically significant differences from all control groups (Fig. 7B). This indicates that the positive selection phase was required to increase the initial proportion of modified cells and to decrease tumor growth after GCV treatment.

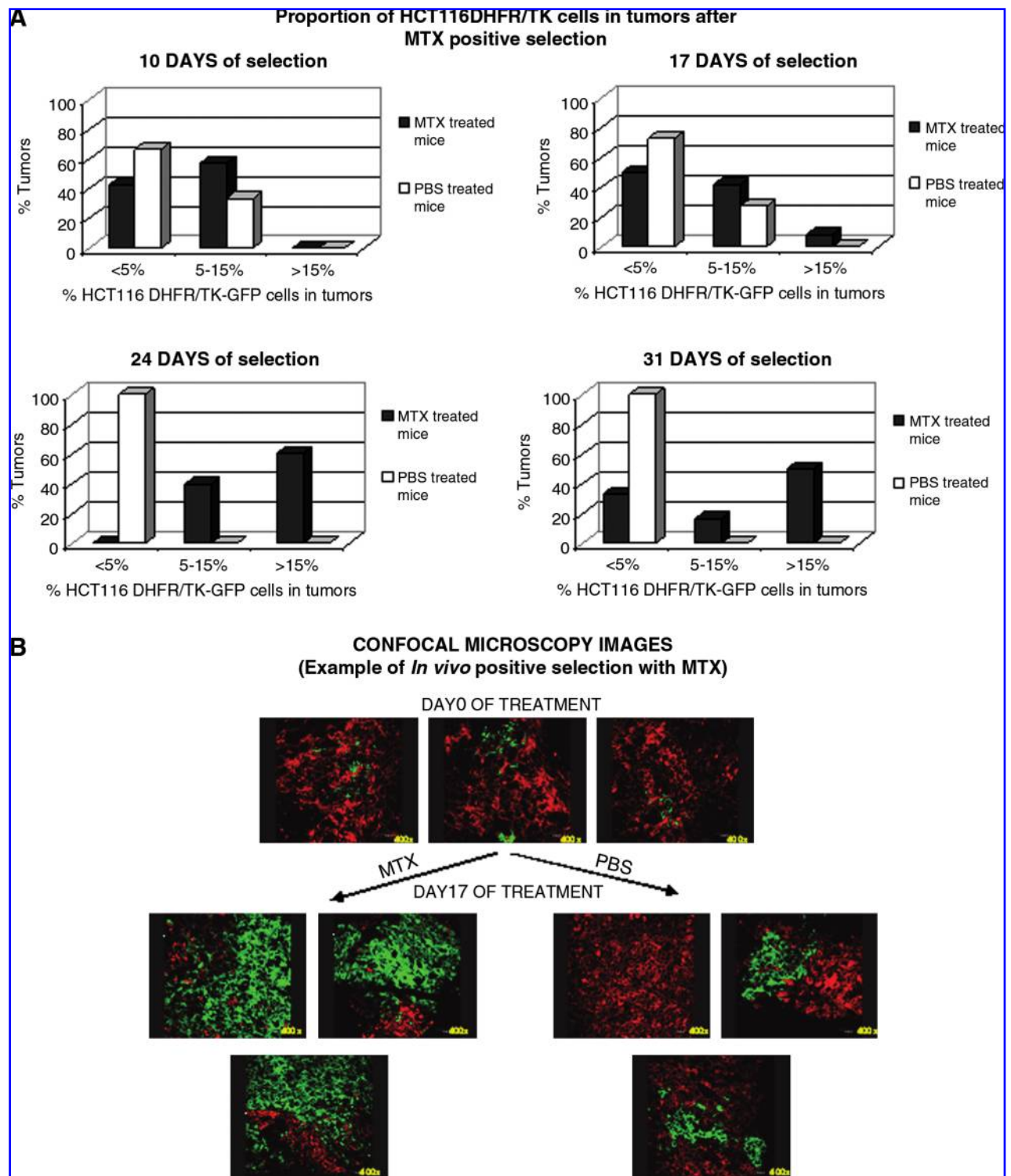


FIG. 5. *In vivo* positive selection of HCT116DHFR/TK-GFP cells. Subcutaneous xenografts were established in nude mice by inoculation of a mixture of 3.5×10^6 cells containing 1% HCT116DHFR/TK-GFP cells and 99% HCT116-RFP cells. Fifteen days later animals were treated with MTX (9 mg/kg; solid columns) or PBS (open columns) intraperitoneally three times per week. On the indicated day of selection, animals were killed and tumors were processed for confocal microscopy. To compensate for cell heterogeneity within tumors, three images ($\times 100$ and $\times 400$) were taken from the same section. (A) The percentage of GFP and RFP cells was estimated and tumors were distributed into three groups according to the amount of HCT116DHFR/TK-GFP cells (<5%, 5–15%, and >15%). Under MTX, the parental population of most tumors was replaced by the gene-modified cells (from 1 to >15%). (B) Representative images (original magnification, $\times 400$) of a tumor before treatment and after 17 days of MTX or mock treatment are shown. Color images available online at www.liebertonline.com/hum.

Discussion

Cancer gene therapy efficacy depends on transducing a high proportion of tumor cells *in vivo*. To improve gene transfer, modified viral vectors have been used but still the proportion of transfected tumor cells is limited (Rainov, 2000; Rainov and Ren, 2003; Immonen *et al.*, 2004). This limitation may be addressed *in vivo* by providing a selective advantage to transfected tumor cells (positive selection). After increasing DHFR/TK-transfected cells during a course of positive selection with MTX, the tumor may become sensitive to GCV and eradicated by GCV treatment. The bystander effect could eliminate tumors even with incomplete replacement of tumor cells (Freeman *et al.*, 1993). The transduction of chemoresistance and chemosensitivity genes as a fusion protein in an episomal plasmid increases the safety of this strategy because it reduces the possibility that only the chemoresistance gene is expressed in the target cells.

Despite obtaining an effective level of positive-negative selection *in vitro*, we could not eradicate all tumor cells *in vivo*. Several factors can explain these results. First, although DHFR/TK-transfected tumor cells increased proportionally in the tumors, *in vivo* positive selection with MTX did not result in population replacement as efficiently as *in vitro*. Whereas the *in vitro* experiments showed that the transfected population could increase from 0.1 to 90% (Fig. 3B), *in vivo* only 15% transfected cells could be reached from the 1% initial proportion (Fig. 5A). Poor bioavailability of MTX *in vivo* could explain these results. We tried various MTX administration schedules and ultimately chose a schedule of 9-mg/kg MTX three times per week because there was a 15% decrease in HCT116 tumor growth on day 17 of treatment compared with mock-treated mice (data not shown). More aggressive schedules resulted in MTX-limiting toxicity. Second, the fast

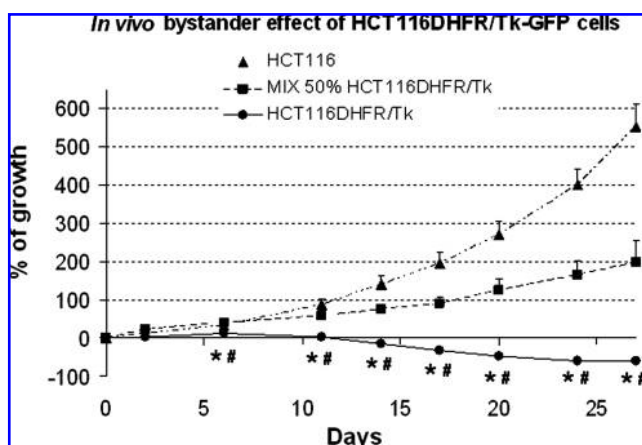


FIG. 6. *In vivo* bystander effect of HCT116DHFR/TK-GFP cells. Subcutaneous xenografts were established in nude mice by inoculation of a mixture of 3.5×10^6 cells containing 100% HCT116-RFP cells, 100% HCT116DHFR/TK-GFP cells, or a mixture of 50% of each cell type. Once tumors were palpable, animals started GCV treatment. Tumor growth relative to the first day of GCV treatment is shown ($n = 6-8$). * $p < 0.05$, significant difference between the HCT116 group and the HCT116DHFR/TK-GFP group; # $p < 0.05$, significant difference between the MIX 50% HCT116DHFR/TK-GFP group and the HCT116DHFR/TK-GFP group.

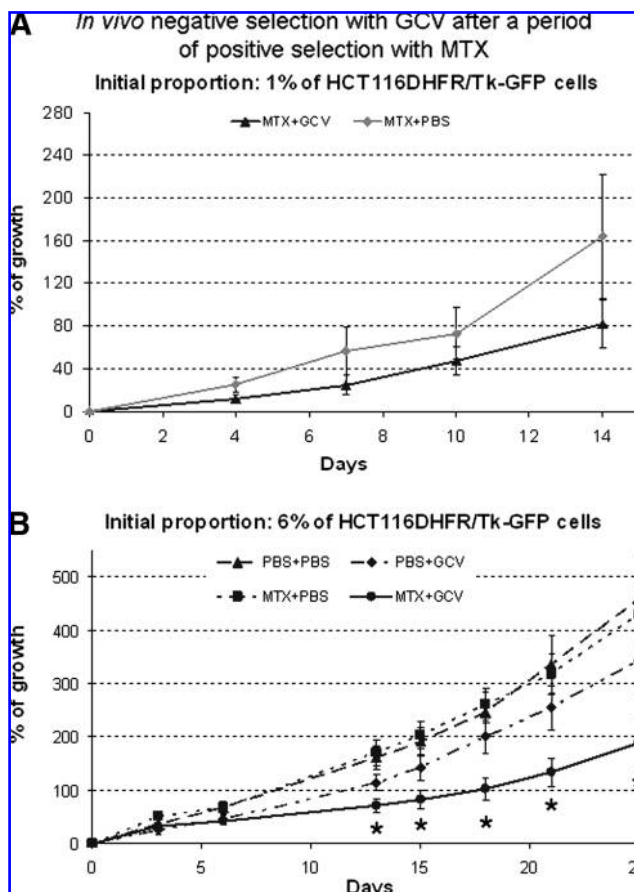


FIG. 7. *In vivo* negative selection with GCV. (A) Subcutaneous xenografts were established in nude mice by inoculation of a mixture of 1.6×10^6 cells containing 1% HCT116DHFR/TK-GFP cells and 99% HCT116-RFP cells. One day later, animals were treated with MTX (9 mg/kg) or PBS three times weekly. When tumors were palpable, animals were treated with GCV. Tumor growth relative to the first day of GCV treatment is shown ($n = 9$). (B) Although tumors that underwent a previous phase of positive selection showed a slower growth trend, the effect of GCV was not sufficient to yield significant differences. Subcutaneous xenografts were established in nude mice by inoculation of a mixture of 3.5×10^6 cells containing 6% HCT116DHFR/TK-GFP cells and 94% HCT116-RFP cells. One day later, animals were randomly allocated to four groups (MTX+PBS, MTX+GCV, PBS+PBS, and PBS+GCV) and animals were treated with MTX or PBS according to the same schedule of the experiment described previously. When tumors were palpable, animals were treated with GCV. Tumor growth relative to the first day of GCV treatment is shown ($n = 9$). * $p < 0.05$, significant difference between all control groups and the MTX+GCV group.

growth rate of HCT116 cells did not allow a long period of positive and negative selection. Third, when we generated tumors with 1% transfected tumor cells and then began MTX treatment, transfected cells formed individual colonies. Thus the increase in transfected tumor cells was heterogeneous in the tumors and the bystander effect would not be as efficient as in transfected cells homogeneously distributed throughout the tumors. Moreover, we observed great heterogeneity in the

proportion of transfected cells among MTX-treated tumors, indicating that under the same conditions cell competition was highly variable. When we used an initial transfected population of 6% an increment of transfected cells after positive selection was obtained and their distribution was more homogeneous in the tumors and among MTX-treated tumors. In this way we achieved a proportion of transfected cells to nontransfected cells that was sufficient to decrease tumor growth in treated mice in a model without any bystander effect. Fourth, although HCT116DHFR-TK-GFP cells are sensitive to GCV *in vitro* (Fig. 2B) and *in vivo* (Fig. 6), this model did not show any bystander effect. *In vitro* this lack of bystander effect is clear from the presence of a parental cell monolayer that remains intact around the plaques left by the dying colonies of transfected cells (Fig. 4A). In a bystander effect experiment mixing HCT116DHFR/TK-GFP cells with HCT116-RFP cells at various proportions, we confirmed *in vitro* that transfected cells could not induce the death of nontransfected cells on GCV treatment (data not shown). Moreover, tumors containing 50% HCT116DHFR/TK-GFP cells plus 50% HCT116-RFP cells continued growing after GCV treatment, confirming the absence of any bystander effect in this tumor model *in vivo*. Therefore, although we had effective positive selection, and transfected cells were indeed sensitive to the prodrug, a bystander effect would be required to eliminate all the tumors. In any case, it is also important to note the statistically significant therapeutic effect obtained with a positive and negative selection strategy in a model without any bystander effect (Fig. 7B).

We are now applying this positive-negative selection system to a tumor model that has a higher bystander effect of HSV-TK/GCV therapy because of high content of gap junctions (Carrio *et al.*, 2001). In this model the observed increase from 1% to more than 15% TK-positive cells that occurred during the positive selection period could be enough to eradicate all tumors. Burrows and colleagues (2002) presented the TK bystander effect as a percentage of dye transfer in eight glioma cell lines (mean, 65.3; SE, 8.0), seven melanoma cell lines (mean, 45.8; SE, 9.3), and nine colorectal carcinoma cell lines (mean, 12.2; SE, 7.1) including HCT116. Dye transfer-quantified gap junction intercellular communication is implicated directly in the efficacy of the bystander effect (Nicholas *et al.*, 2003). HCT116 had a low level of gap junctions, in accordance with the lack of bystander effect we have observed. To further increase the bystander effect of TK we are also exploring the use of TK modified with the HIV Tat protein transduction domain (Cascante *et al.*, 2005).

Alternatively, other genes for positive-negative *in vivo* selection may be used. Unger and colleagues have reported a similar strategy to enrich tumor cells before suicide gene therapy (Unger *et al.*, 2007). A fusion gene of cytosine deaminase and uracil phosphoribosyltransferase (*FCU1* fusion gene) was used along with *N*-(phosphonacetyl)-*L*-aspartate (PALA) and cytosine to enrich the transfected cells. 5-Fluorocytosine (5-FC) was used as a prodrug for negative selection of transfected cells. Starting from subcutaneous tumors with a 6% proportion of transfected cells, the administration of PALA and cytosine to mice resulted in foci of transfected cells that were more evident than without those drugs. As in our case, the intratumoral distribution was heterogeneous. *In vivo* 5-FC treatment after PALA-cytosine enrichment successfully decreased tumor growth, although not

completely. Our results with tumors with 6% transfected cells treated with MTX and GCV showed similar results. It is expected that the sensitivity of a given cell line to PALA or MTX and to the activated 5-FC or ganciclovir will determine whether *FCU1* or the DHFR/TK fusion gene is a better option for this type of therapy. Clearly, our *in vivo* increase from a 1% proportion to more than 15% transfected cells is substantial and this increase leads to a therapeutic effect after negative selection with GCV. We suggest that the major limitation with the DHFR/TK system has been the absence of any bystander effect in the HCT116 model.

In general, the proper selection of candidate genes for positive and negative selection must take into account several parameters. For safety, the gene used for positive selection should not confer resistance to a drug used in the clinical management of the tumor to be treated. For example, as MTX may be used in lymphoma treatment, DHFR should not be used for positive selection in this tumor type because it would confer resistance to MTX if the gene therapy was given previous to or concomitant with the chemotherapy. If the competition gene therapy were applied after MTX-based chemotherapy, relapsed tumors would already be resistant to MTX and there would not be any possibility for positive selection. Although a fusion gene such as DHFR/TK may be used in an effort to minimize the possibility of conferring positive selection without the accompanying suicide mechanism, one cannot ensure that the TK gene becomes nonfunctional by mutation, and then MTX resistance would pose a problem to the established clinical treatment. For these reasons MTX positive selection may be an option for tumors other than lymphomas. On the other hand, competition gene therapy must confer resistance to a drug that has a negative effect in the nontransduced part of the tumor, although such a drug is not used in the clinical treatment. It is possible to choose genes that confer resistance to drugs used as third or later lines of treatment. In colon carcinoma, it would not be appropriate to confer resistance to 5-FU, oxaliplatin, leucovorin, irinotecan, capecitabine, and mitomycin C, but it might be considered acceptable to use aldehyde reductase or alkylguanine DNA-transferase to provide resistance to alkylating agents such as cyclophosphamide. Although suicide genes such as TK can induce a bystander effect in models with gap junctions, selecting genes for negative selection that do not depend on gap junctions should improve the prospects of the positive-negative selection strategy.

We have focused on the process of positive-negative selection after establishing tumors with 1 or 6% transfected cells. A pending question for this treatment concerns how the selecting genes are going to be delivered to tumors. Transfection needs to be stable, either by genomic integration or episomal replication and segregation to daughter cells. The pEPI-DHFR/TK plasmid presented here contains these later elements and it could be used in combination with nonviral vectors such as tumor-targeted liposomes to test the competition-suicide strategy after systemic delivery. For a higher transduction rate several viral vectors could be used such as adeno-associated virus (AAV) (Hacker *et al.*, 2005) or helper-dependent adenoviral vectors containing Epstein-Barr virus (EBV) episomal replication elements (Dorigo *et al.*, 2004; Kreppel and Kochanek, 2004) or adeno-transposons (Yant *et al.*, 2002).

In conclusion, we prove the concept that a fusion gene, which confers a selective advantage and a suicide mechanism, can be used for competition-suicide cancer gene therapy in which gene-modified cells outcompete tumor cells (positive selection) and are later eliminated (negative selection).

New drug resistance genes should be tested to improve positive selection *in vivo* and new prodrug-converting genes should be tested to improve the bystander effect and negative selection *in vivo*.

Acknowledgments

The authors thank Neus Bayo-Puxan, Alena Gros, Juanjo Rojas-Exposito, Sonia Guedan, and Marta Gimenez for technical assistance. The authors thank Esther Castaño for technical support in flow cytometric data analysis and Benjamin Torrejon for technical support in the use of confocal microscopy. J.M-Q. was supported by a graduate student fellowship from the Fundació Privada Institut d'Investigació Biomèdica de Bellvitge (IDIBELL). Funding was provided by BIO2005-08682-C03 from the Ministerio de Educación y Ciencia, by the Departament d'Universitats, Recerca i Societat de la Informació from the Generalitat de Catalunya (2005 SGR 00727), and by the CIBER de Enfermedades Raras, an initiative of the ISCIII. R.A. belongs to the Network of Cooperative Research on Cancer (C03-10), Instituto de Salud Carlos III of the Ministerio de Sanidad y Consumo, Government of Spain.

Author Disclosure Statement

The authors declare no competing financial interests.

References

- Banerjee, D., Zhao, S.C., Li, M.X., Schweitzer, B.I., Mineishi, S., and Bertino, J.R. (1994). Gene therapy utilizing drug resistance genes: A review. *Stem Cells* 12, 378–385.
- Bertino, J.R., Goker, E., Gorlick, R., Li, W.W., and Banerjee, D. (1996). Resistance mechanisms to methotrexate in tumors. *Oncologist* 1, 223–226.
- Bosch, I., and Croop, J. (1996). P-glycoprotein multidrug resistance and cancer. *Biochim. Biophys. Acta* 1288, F37–F54.
- Burrows, F.J., Gore, M., Smiley, W.R., Kanemitsu, M.Y., Jolly, D.J., Read, S.B., Nicholas, T., and Kruse, C.A. (2002). Purified herpes simplex virus thymidine kinase retroviral particles. III. Characterization of bystander killing mechanisms in transfected tumor cells. *Cancer Gene Ther.* 9, 87–95.
- Campione-Piccardo, J., Rawls, W.E., and Bacchetti, S. (1979). Selective assay for herpes simplex viruses expressing thymidine kinase. *J. Virol.* 31, 281–287.
- Carrío, M., Mazo, A., Lopez-Iglesias, C., Estivill, X., and Fillat, C. (2001). Retrovirus-mediated transfer of the herpes simplex virus thymidine kinase and connexin26 genes in pancreatic cells results in variable efficiency on the bystander killing: Implications for gene therapy. *Int. J. Cancer* 94, 81–88.
- Cascante, A., Huch, M., Rodriguez, L.G., Gonzalez, J.R., Costantini, L., and Fillat, C. (2005). Tat8-TK/GCV suicide gene therapy induces pancreatic tumor regression *in vivo*. *Hum. Gene Ther.* 16, 1377–1388.
- Culver, K.W., Ram, Z., Wallbridge, S., Ishii, H., Oldfield, E.H., and Blaese, R.M. (1992). *In vivo* gene transfer with retroviral vector-producer cells for treatment of experimental brain tumors. *Science* 256, 1550–1552.
- de Anta, J.M., Mayo, C., Sole, F., Salido, M., Espinet, B., Corzo, C., Petzold, M., Villa, O., Serrano, S., Real, F.X., and Mayol, X. (2006). Methotrexate resistance *in vitro* is achieved by a dynamic selection process of tumor cell variants emerging during treatment. *Int. J. Cancer* 119, 1607–1615.
- Diaz, B., and Moreno, E. (2005). The competitive nature of cells. *Exp. Cell Res.* 306, 317–322.
- Dorigo, O., Gil, J.S., Gallaher, S.D., Tan, B.T., Castro, M.G., Lowenstein, P.R., Calos, M.P., and Berk, A.J. (2004). Development of a novel helper-dependent adenovirus-Epstein-Barr virus hybrid system for the stable transformation of mammalian cells. *J. Virol.* 78, 6556–6566.
- Ercikan-Abali, E.A., Mineishi, S., Tong, Y., Nakahara, S., Waltham, M.C., Banerjee, D., Chen, W., Sadelain, M., and Bertino, J.R. (1996). Active site-directed double mutants of dihydrofolate reductase. *Cancer Res.* 56, 4142–4145.
- Freeman, S.M., Abboud, C.N., Whartenby, K.A., Packman, C.H., Koeplin, D.S., Moolten, F.L., and Abraham, G.N. (1993). The “bystander effect”: Tumor regression when a fraction of the tumor mass is genetically modified. *Cancer Res.* 53, 5274–5283.
- Hacker, U.T., Wingenfeld, L., Kofler, D.M., Schuhmann, N.K., Lutz, S., Herold, T., King, S.B., Gerner, F.M., Perabo, L., Rabinowitz, J., McCarty, D.M., Samulski, R.J., Hallek, M., and Buning, H. (2005). Adeno-associated virus serotypes 1 to 5 mediated tumor cell directed gene transfer and improvement of transduction efficiency. *J. Gene Med.* 7, 1429–1438.
- Immonen, A., Vapalahti, M., Tynnela, K., Hurskainen, H., Sandmair, A., Vanninen, R., Langford, G., Murray, N., and Yla-Herttuala, S. (2004). AdvHSV-tk gene therapy with intravenous ganciclovir improves survival in human malignant glioma: A randomised, controlled study. *Mol. Ther.* 10, 967–972.
- Jenke, B.H., Fetzter, C.P., Stehle, I.M., Jonsson, F., Fackelmayer, F.O., Conrad, H., Bode, J., and Lipps, H.J. (2002). An episomally replicating vector binds to the nuclear matrix protein SAF-A *in vivo*. *EMBO Rep* 3, 349–354.
- Kreppel, F., and Kochanek, S. (2004). Long-term transgene expression in proliferating cells mediated by episomally maintained high-capacity adenovirus vectors. *J. Virol.* 78, 9–22.
- Licht, T., Herrmann, F., Gottesman, M.M., and Pastan, I. (1997). *In vivo* drug-selectable genes: A new concept in gene therapy. *Stem Cells* 15, 104–111.
- Mayer-Kuckuk, P., Banerjee, D., Malhotra, S., Doubrovin, M., Iwamoto, M., Akhurst, T., Balatoni, J., Bornmann, W., Finn, R., Larson, S., Fong, Y., Gelovani Tjuvajev, J., Blasberg, R., and Bertino, J.R. (2002). Cells exposed to antifolates show increased cellular levels of proteins fused to dihydrofolate reductase: A method to modulate gene expression. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 99, 3400–3405.
- Mayer-Kuckuk, P., Doubrovin, M., Gusani, N.J., Gade, T., Balatoni, J., Akhurst, T., Finn, R., Fong, Y., Koutcher, J.A., Larson, S., Blasberg, R., Tjuvajev, J.G., Bertino, J.R., and Banerjee, D. (2003). Imaging of dihydrofolate reductase fusion gene expression in xenografts of human liver metastases of colorectal cancer in living rats. *Eur. J. Nucl. Med. Mol. Imaging* 30, 1281–1291.
- Meisel, R., Bardenheuer, W., Strehlow, C., Sorg, U.R., Elmaagacli, A., Seeber, S., Flasshove, M., and Moritz, T. (2003). Efficient protection from methotrexate toxicity and selection of transduced human hematopoietic cells following gene transfer of dihydrofolate reductase mutants. *Exp. Hematol.* 31, 1215–1222.
- Mercola, K.E., Stang, H.D., Browne, J., Salser, W., and Cline, M.J. (1980). Insertion of a new gene of viral origin into bone marrow cells of mice. *Science* 208, 1033–1035.

- Mineishi, S., Nakahara, S., Takebe, N., Banerjee, D., Zhao, S.C., and Bertino, J.R. (1997). Co-expression of the herpes simplex virus thymidine kinase gene potentiates methotrexate resistance conferred by transfer of a mutated dihydrofolate reductase gene. *Gene Ther.* 4, 570–576.
- Moreno, E., and Basler, K. (2004). dMyc transforms cells into super-competitors. *Cell* 117, 117–129.
- Moreno, E., Basler, K., and Morata, G. (2002). Cells compete for decapentaplegic survival factor to prevent apoptosis in *Drosophila* wing development. *Nature* 416, 755–759.
- Nicholas, T.W., Read, S.B., Burrows, F.J., and Kruse, C.A. (2003). Suicide gene therapy with herpes simplex virus thymidine kinase and ganciclovir is enhanced with connexins to improve gap junctions and bystander effects. *Histol. Histopathol.* 18, 495–507.
- Rainov, N.G. (2000). A phase III clinical evaluation of herpes simplex virus type 1 thymidine kinase and ganciclovir gene therapy as an adjuvant to surgical resection and radiation in adults with previously untreated glioblastoma multiforme. *Hum. Gene Ther.* 11, 2389–2401.
- Rainov, N.G., and Ren, H. (2003). Clinical trials with retrovirus mediated gene therapy: What have we learned? *J. Neurooncol.* 65, 227–236.
- Sauerbrey, A., McPherson, J.P., Zhao, S.C., Banerjee, D., and Bertino, J.R. (1999). Expression of a novel double-mutant dihydrofolate reductase-cytidine deaminase fusion gene confers resistance to both methotrexate and cytosine arabinoside. *Hum. Gene Ther.* 10, 2495–2504.
- Unger, M.M., Wahl, J., Ushmorov, A., Buechele, B., Simmet, T., Debatin, K.M., and Beltinger, C. (2007). Enriching suicide gene bearing tumor cells for an increased bystander effect. *Cancer Gene Ther.* 14, 30–38.
- Yant, S.R., Ehrhardt, A., Mikkelsen, J.G., Meuse, L., Pham, T., and Kay, M.A. (2002). Transposition from a gutless adenoviral transposon vector stabilizes transgene expression *in vivo*. *Nat. Biotechnol.* 20, 999–1005.

Address correspondence to:

Dr. Ramon Alemany
Institut Català d'Oncologia
Av. Gran Via s/n km 2.7
L'Hospitalet de Llobregat
08907 Barcelona, Spain

E-mail: ralemany@iconcologia.net

Received for publication September 5, 2008;
accepted after revision March 12, 2009.

Published online: April 7, 2009.

**Positive selection of gene-modified cells increases the efficacy of pancreatic cancer
suicide gene therapy**

J Martinez-Quintanilla, M Cascallo, A Gros, C Fillat and R Alemany

Molecular Cancer Therapeutics 2009;8(11). November 2009

El adenocarcinoma pancreático humano presenta un pronóstico muy desfavorable debido a su agresividad, a la frecuente presencia de metástasis en el momento del diagnóstico y a la ausencia de terapias efectivas para su tratamiento. Entre las terapias experimentales, la terapia génica suicida ha sido propuesta para el tratamiento de este tipo de tumores. Aún así, la eficacia de esta estrategia en la clínica ha sido muy limitada debido, principalmente, al bajo número de células tumorales modificadas con genes suicidas en pacientes.

En este segundo artículo proponemos aplicar la estrategia de selección positiva-negativa en un modelo de cáncer de páncreas. Para ello, se utilizó el gen de resistencia a multidrogas MDR1, como marcador de selección positiva, y el gen suicida TK, como marcador de selección negativa. Con la finalidad de detectar las células modificadas por microscopia de fluorescencia, estas células se marcaron con el gen de la GFP.

Las células NP18-MDR/TK mostraron una sobreexpresión de la pGP, el producto del gen MDR1, y una resistencia a docetaxel *in vitro* e *in vivo*. Esta resistencia a la droga de selección permitió enriquecer de 6 a 8 veces la proporción de células modificadas en tumores mixtos con células parentales NP18. Por otro lado, el estudio del sistema TK/GCV en esta línea tumoral mostró un potente efecto colateral, tanto *in vitro* como *in vivo*. Dicho efecto permitió eliminar un cultivo mixto con sólo un 12.5% de células NP18-MDR/TK y la regresión completa de los tumores con un 25% de dichas células.

La estrategia combinada de la selección positiva y negativa a partir de tumores con un 4% o un 10% de células modificadas mostró una eficacia antitumoral superior a la obtenida con la terapia suicida *per se*. En el caso de los tumores formados por un 10% de células modificadas, después de la selección positiva con docetaxel y de la selección negativa con GCV, se consiguió la regresión completa de los tumores.

Esta aproximación confirma que el enriquecimiento en el tumor de las células modificadas con el gen suicida TK puede compensar los bajos niveles de transducción de los vectores de transferencia utilizados en la clínica.

Positive selection of gene-modified cells increases the efficacy of pancreatic cancer suicide gene therapy

Jordi Martinez-Quintanilla,¹ Manel Cascallo,¹
Alena Gros,¹ Cristina Fillat,² and Ramon Alemany¹

¹Gene and Viral Therapy Group, IDIBELL-Catalan Institute of Oncology (ICO), L'Hospitalet de Llobregat and ²Center for Genomic Regulation, UPF, Parc de Recerca Biomèdica de Barcelona and Centro de Investigación Biomédica en Red de Enfermedades Raras (CIBERER-ISCIII), Barcelona, Spain

Abstract

Thymidine kinase (TK)-mediated suicide gene therapy has been considered for the treatment of pancreatic cancer. However, despite a bystander effect, the proportion of transduced tumor cells has proven too low to result in efficacy. We propose the use of a drug-selectable marker (MDR1) to enrich TK-expressing cells using chemotherapy. This enrichment or positive selection phase may increase the efficacy of suicide gene therapy. To test this strategy, we generated stable NP18MDR/TK-GFP transfectants and showed docetaxel resistance *in vivo*. Mixed tumors of MDR/TK-expressing cells and parental NP18 cells were established and docetaxel was used to increase the proportion of TK-expressing cells. After this positive selection phase, suicide gene therapy with ganciclovir was applied. Upon positive selection, the proportion of TK-expressing cells increased from 4% to 22%. Subsequent suicide gene therapy was more effective compared with a control group without positive selection. Starting with 10% of TK-expressing cells the positive-negative selection strategy completely inhibited tumor growth. Taken together, these results suggest that a positive-negative selection strategy based on *MDR* and *TK* genes represents an efficient way to increase the proportion of TK-

expressing cells in the tumor and the efficacy of TK-mediated suicide gene therapy. [Mol Cancer Ther 2009;8(11): 3098–107]

Introduction

Pancreatic cancer is the fourth leading cause of cancer-related death in most industrialized countries, with an average survival after diagnosis of 3 to 6 months (1). Conventional treatments for pancreatic cancer are scarcely effective, and the development of new therapeutic approaches is of major interest. Suicide or prodrug-converting cancer gene therapy may represent a good approach if potent inducers of cell death and efficient gene transfer systems are found. The herpes simplex virus thymidine kinase (*HSV-TK*) gene is the prodrug-converting gene therapy system most widely used in suicide gene therapy (2). Expression of *HSVTK* within tumor cells selectively sensitizes them to the antiviral agent ganciclovir. The basis of the selective sensitivity is caused by preferential monophosphorylation of nontoxic ganciclovir by the viral thymidine kinase gene (*TK*). Cellular kinases further phosphorylate the drug into triphosphate forms that become incorporated into nascent DNA, inhibiting DNA synthesis and leading eventually to cell death (3). In addition to selective sensitization, a further advantage of this system is the bystander cytotoxic effect on nontransduced cells associated with intercellular transfer of phosphorylated ganciclovir to surrounding cells (4). This suicide gene therapy has shown therapeutic efficacy in preclinical studies (5), but poor gene transfer efficiency has limited clinical efficacy (6). Better delivery vectors (3) or cell carriers (7, 8) may allow the transfer of enough suicide genes to eliminate all tumor cells. A new approach to improve suicide therapy efficacy is based on conferring a selective advantage to transduced cells (9, 10).

Conventional chemotherapy is the standard treatment for most types of advanced cancers. Docetaxel has been widely used in the treatment of cancers, including advanced pancreatic adenocarcinoma (11). Unfortunately, the initial response to this agent may be hampered by the development of multidrug-resistant cells (12). Multidrug resistance was first described in 1970 after selection in Chinese hamster ovarian cancer cells exposed to increasing concentrations of actinomycin D (13). The resistance to chemotherapy has been termed “intrinsic” when the tumor initially fails to respond to anticancer agents and “acquired” when failure occurs after exposure to chemotherapeutic agents to which they are initially sensitive. Both intrinsic and acquired drug resistance can be obstacles to pancreatic adenocarcinoma chemotherapy (12). The most important cause of chemoresistance is the intrinsic or acquired overexpression of multidrug resistance gene1 (*MDR1*; ref. 12). *MDR1* encodes the membrane-bound P-glycoprotein, which was associated

Received 4/17/09; revised 9/9/09; accepted 9/14/09; published OnlineFirst 11/3/09.

Grant support: J. Martinez-Quintanilla was supported by a graduate student fellowship from the Fundació Privada Institut d'Investigació Biomèdica de Bellvitge (IDIBELL). Funding was provided by BIO2008-04692 from the “Ministerio de Educación y Ciencia”, by the Departament d'Universitats, Recerca i Societat de la Informació from the Generalitat de Catalunya (2005 SGR 00727). R. Alemany belongs to the Network of Cooperative Research on Cancer (CO3-10), Instituto de Salud Carlos III of the Ministerio de Sanidad y Consumo, Government of Spain. The CIBER de Enfermedades Raras is an initiative of the ISCIII.

The costs of publication of this article were defrayed in part by the payment of page charges. This article must therefore be hereby marked *advertisement* in accordance with 18 U.S.C. Section 1734 solely to indicate this fact.

Requests for reprints: Ramon Alemany, Institut Català d'Oncologia, Barcelona, Spain. Phone: 34-932607462; Fax: 34-932607466. E-mail: ralemany@iconcologia.net

Copyright © 2009 American Association for Cancer Research.

doi:10.1158/1535-7163.MCT-09-0350

with poor prognosis (14). However, negative *MDR1* expression in a tumor does not necessarily guarantee the success of chemotherapy, because during tumor progression, or due to the effect of treatment itself, the P-glycoprotein may be induced (15). On the other hand, multidrug resistant genes have been used in chemoprotective gene therapy or as selectable markers *in vivo*. Human hematopoietic cells have been transferred with chemoresistant genes to protect bone marrow from the adverse effects of high-dose chemotherapy (16). To confer biosafety to this strategy, hematopoietic cells were transfected with a vector coexpressing *MDR1* and *TK* genes, which offers the possibility to kill undesirable MDR-transfected tumor cells (17).

Pancreatic carcinoma cell lines, like other neoplasms, are heterogeneous with regard to their sensitivity to chemotherapeutic agents and may contain different expressions of drug-resistant phenotypes (intrinsic chemoresistant cells). Moreover, malignant cells continuously change their phenotype (15), and better adapted tumor cells gain selection advantages (acquired chemoresistant cells). Some experimental data show that an originally *MDR1*-negative tumor may induce overexpression of *MDR1* and become resistant after chemotherapeutic treatments (18). The acquired resistance usually arises several weeks after treatment. In this time-window tumor cells that have intrinsic *MDR1* overexpression or that induce it faster show a proliferative advantage against sensitive tumor cells.

We aimed to use the *MDR1* gene as a drug selectable marker to confer a selective advantage to TK-expressing cells to increase their proportion in the tumor. Under chemotherapy, MDR/TK expressing cells should be enriched, and a later ganciclovir treatment should be more efficacious. To apply this strategy in a poor prognostic tumor type, a pancreatic adenocarcinoma model sensitive to docetaxel was used. Starting with tumors with 10% of TK-expressing cells, after chemotherapy treatment, modified cells colonized the entire tumor and suicide therapy eradicated tumors.

Materials and Methods

Cell Culture and Reagents

The human pancreatic adenocarcinoma cell line NP18 was established in our laboratory (19) and grown in DMEM containing 5% fetal bovine serum and 1% of penicillin and streptomycin (P/S). Cells were maintained at 37°C and 5% CO₂ in a humidified atmosphere and were periodically tested for mycoplasma. Taxotere (docetaxel) was provided by Sanofi Aventis S.A.. A 10 mg/mL stock solution was prepared in a polysorbate buffer according to the manufacturer's protocols and dilutions were made in PBS. Ganciclovir was provided by Roche Diagnostics. A stock solution at 100 mg/mL and dilutions were prepared in PBS.

Generation of Stable NP18MDR/TK-GFP Cells

NP18 cells were seeded in a 6-well plate and transfected 24 h later with 3 µg of retroviral expression vector pHaMDR/AMSHa [kindly provided by Josep Aran, Institut d'Investigacions Biomèdiques de Bellvitge (IDIBELL), Barcelona, Spain; ref. 20] using FuGENE 6 transfection reagent (Roche

Diagnostics) according to the manufacturer's protocols. PHaMDR/AMSHa plasmid had *MDR1* gene in a backbone of a Harvei retrovirus. Transfected cells were incubated with 4 ng/mL of docetaxel for 10 d to generate NP18 docetaxel-resistant cells.

To obtain TK-expressing cells, NP18MDR cells were seeded in a 6-well plate, transfected 24 h later with 3 µg of pEPI-DHFR/TK plasmid, generated in our laboratory, with FuGENE 6 transfection reagent according to the manufacturer's protocols and selected with 0.625 µmol/L of methotrexate (MTX) and 4 ng/mL of docetaxel. To label NP18MDR/TK with green fluorescent protein (GFP), the packaging cell line PA317DsGFP (kindly provided by Fernando Larcher, Centro de Investigaciones Energéticas, Medioambientales y Tecnológicas, CIEMAT, Madrid, Spain) was used to produce a Moloney leukemia vector expressing GFP. Cells were grown in DMEM 10% fetal bovine serum, and medium was replaced when cells reached 70% to 80% of confluence and PA317DsGFP conditioned medium was used to infect NP18MDR/TK cells in the presence of 8 µg/mL of Polybrene (Sigma-Aldrich) and DMEM 5% fetal bovine serum. Twelve hours after infection, medium was replaced with fresh medium and cells were seeded in a 96-well plate at 2 to 3 cells/well and incubated with 0.625 µmol/L of MTX and 4 ng/mL of docetaxel. After 21 d of selection and under fluorescent microscopy we obtained NP18MDR/TK-GFP clones.

In vitro Characterization of NP18MDR and NP18MDR/TK-GFP Cells

To examine the expression of human P-glycoprotein on the cell surface of N18, NP18MDR and NP18MDR/TK-GFP cells, fluorescence activated cell sorting (FACS) analysis was used in which cells were incubated with a human P-glycoprotein-specific monoclonal antibody MRK16 (21). Cells (5×10^5) were trypsinized, washed, and incubated with MRK16 (10 µg/mL in a volume of 50 µL). After 30 min of incubation cells were washed twice with PBS²⁺ (+Ca²⁺/Mg²⁺)/1% bovine serum albumin and incubated with Alexa Fluor 647 goat anti-mouse IgG for 1 h (1:300 dilution in a volume of 100 µL; Invitrogen Molecular Probes). After washing twice with PBS²⁺ (+Ca²⁺/Mg²⁺)/1% bovine serum albumin, cells were resuspended in 300 µL of PBS²⁺ (+Ca²⁺/Mg²⁺)/1% bovine serum albumin and a minimum of 50,000 cells were analyzed by flow cytometry (Becton Dickinson, FACSCalibur system) using 488 nm and 635 nm lasers and CellQuest Pro software. MDR expression was determined in quadruplicates.

To determine docetaxel sensitivity of NP18, NP18MDR, and NP18MDR/TK-GFP transfectants, cells were plated in 96-well plates (5×10^3 cells/well) and incubated with serial dilutions of docetaxel (0, 0.8, 1.5, 3, 6, 12, 24, 49, 97.5, 195, 391, 781, 1,562, 3,125, 6,250, 12,500, 25,000, and 50,000 pg/mL). Cell viability was measured by the MTT assay kit (Sigma-Aldrich) 7 d after treatment according to the manufacturer's protocol. The percentage of cell viability was defined by the equation $T/NT \times 100$, where *T* is the cell viability of treated cells and *NT* is the cell viability of nontreated cells.

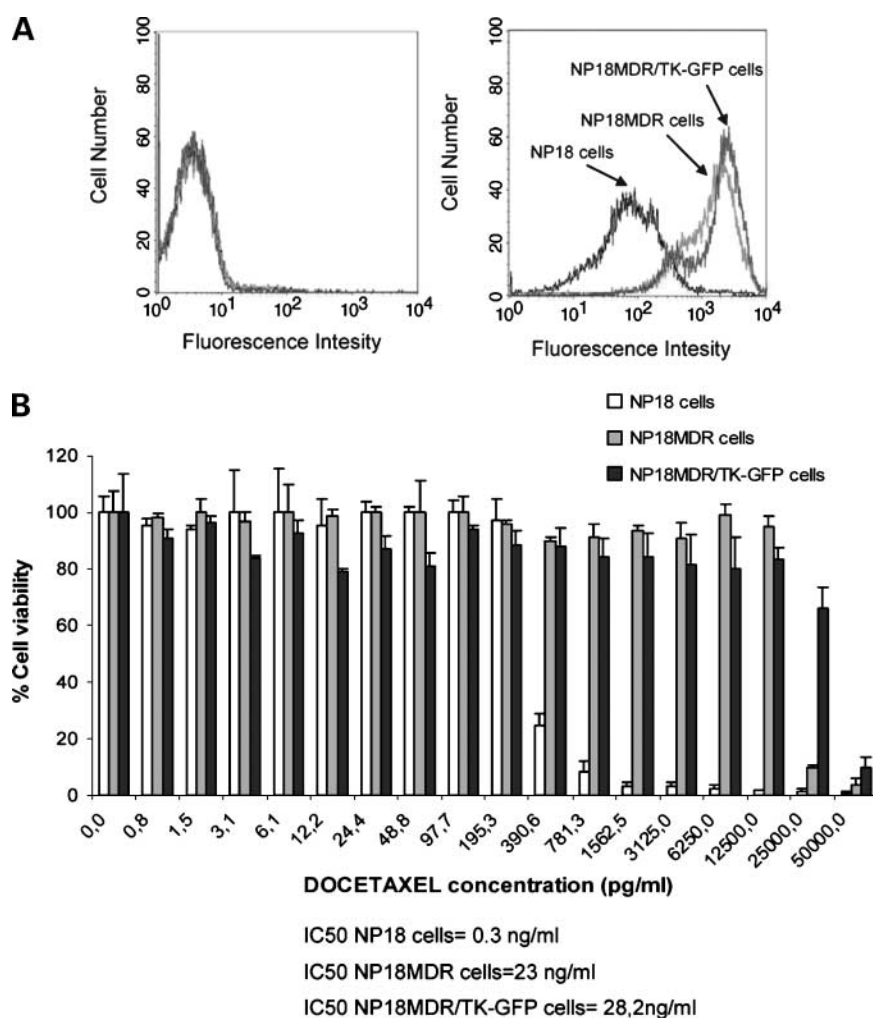


Figure 1. *In vitro* characterization of NP18MDR and NP18MDR/TK-GFP cells. **A**, the expression of human P-glycoprotein on the cell surface of NP18, NP18MDR, and NP18MDR/TK-GFP cells was determined by FACS analysis. Cells were incubated with the human P-glycoprotein-specific monoclonal antibody MRK16, washed, and incubated with Alexa Fluor 647-goat anti-mouse IgG. A minimum of 50,000 cells were analyzed by flow cytometry. MDR expression of NP18, NP18MDR, and NP18MDR/TK-GFP cells with Alexa Fluor 647 antibody (*left*) and with monoclonal antibody MRK16 and Alexa Fluor 647 antibodies (*right*) is shown. **B**, *in vitro* docetaxel sensitivity. NP18 (white bars), NP18MDR (grey bars), and NP18MDR/TK-GFP cells (black bars) were plated in 96-well plates and were incubated with serial dilutions of docetaxel (from 0 to 50,000 pg/mL). Seven days after treatment cell viability was measured by a MTT assay kit. The IC₅₀ of NP18, NP18MDR, and NP18MDR/TK-GFP cells are indicated at the bottom of the figure. Bars, +SD.

***In vivo* Docetaxel Sensitivity of NP18 and NP18MDR/TK-GFP Cells**

To check *in vivo* docetaxel sensitivity of NP18 and NP18MDR/TK-GFP cells, s.c. xenografts were established into the flanks of 4- to 8-week-old male BALB/c *nu/nu* mice by inoculation of 2 to 4 × 10⁶ NP18 cells or NP18MDR/TK-GFP cells. The animals were hosted in the animal facility of the Institut d'Investigacions Biomèdiques de Bellvitge (IDIBELL), in Barcelona, Spain (Association for Assessment and Accreditation of Laboratory Animal Care International, AAALAC unit 1155) and were kept and manipulated in accordance with recommendations of IDIBELL's Ethical Committee of Animal Experimentation. Once tumors reached 100 to 200 mm³, the animals started docetaxel treatment (25 mg/kg ip once every week for 2 wk) or PBS treatment (*n* = 8–10). They were measured two or three times weekly. Tumor volume was calculated according to the equation V (mm³) = $\pi/6$ WL^2 , where L and W are length and width of the tumor, respectively, +SE. The significance of differences in tumor volume rate between treatment group and control group was assessed by the unpaired Student's *t* test.

***In vivo* Positive Selection with Docetaxel**

To allow for *in vivo* positive selection two different initial proportions of NP18MDR/TK-GFP cells were used. S.c. xenografts were established into the flanks of 4- to 8-week-old male BALB/c *nu/nu* mice by inoculation of a mixture of 2 to 4 × 10⁶ cells containing 4% or 10% of NP18MDR/TK-GFP cells mixed with 96% or 90% of parental NP18 cells, respectively. Once tumors reached 100 to 200 mm³, the animals were randomly distributed in two groups (docetaxel and PBS; *n* = 14). Then the animals were treated with PBS or with docetaxel (25 mg/kg ip once every week) for 2 wk in mice with tumors with an initial proportion of 4% NP18MDR/TK-GFP cells or 3 wk in mice with 10% NP18MDR/TK-GFP tumors. Tumors were measured two or three times weekly until they began to regrow. Tumor volume was calculated as above. Percentage of tumor growth was defined by the equation $[(V-V_0)/V_0] \times 100$, where V_0 is the tumor volume on day 0 after starting the treatment. The significance of differences in tumor growth rate between treatment group and control group was assessed by the unpaired Student's *t* test. At the beginning

of docetaxel treatment ($n = 4-6$) and after the positive selection phase ($n = 14$) animals were sacrificed and tumors were excised and fixed with 4% paraformaldehyde in PBS overnight. After washing with PBS, the tumors were incubated with sucrose 5% in PBS (2 h) and sucrose 30% in PBS (overnight). Then the tumors were cryopreserved with OTC embedding medium (Miles Laboratories, Elkhart, IN) and cryosectioned at 5 μm with a cryotome (Global Medical Instrumentation, Shandon Cryotome Cryostat). Sections were mounted with mounting medium with 4',6-diamidino-2-phenylindole (Vectashield, Vector Laboratories, Inc.) and GFP expression was viewed using a fluorescent microscope (Olympus BX51). GFP quantification was done on three fields ($\times 100$) of each section by an external observer blind to the source of the samples. Representative images ($\times 100$) were taken from different tumors of each group.

In vitro Ganciclovir-Sensitivity of NP18 and NP18MDR/TK-GFP Cells

NP18 and NP18MDR/TK-GFP cells were plated in 96-well plates (5×10^3 cells/well) and were incubated with serial dilutions of ganciclovir (0, 0.2, 0.6, 1.3, 2.5, 5, 10, 20, 40, and 80 $\mu\text{g}/\text{mL}$). Cell viability was measured by the MTT

assay kit 6 d after treatment according to the manufacturer's protocol. The percentage of cell viability was defined as in the previous experiments.

In vitro and in vivo Bystander Effect of NP18MDR/TK-GFP Cells with Ganciclovir

To allow for negative selection, *in vitro* and *in vivo* bystander experiments were carried out. NP18 and NP18MDR/TK-GFP cells were plated in 96-well plates at different proportions of transfected cells (0, 0.8, 1.5, 3.1, 6.25, 12.5, 25, 50, and 100%; 5×10^3 cells/well) and were incubated with 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ of ganciclovir. Cell viability was measured by MTT as above 6 d after treatment and the percentage of cell viability was defined.

To do a bystander experiment *in vivo*, s.c. xenografts were established into the flanks of 4- to 8-week-old male BALB/c *nu/nu* mice by inoculation of 2 to 4×10^6 NP18 cells, NP18MDR/TK-GFP cells, or a mixture containing 25% or 50% NP18MDR/TK-GFP cells mixed with NP18 cells. Once tumors reached 100 to 200 mm^3 , the animals were treated with ganciclovir (50–75 mg/Kg i.p. daily for 14 d; $n = 8$). Tumors were measured two or three times weekly.

In vivo Positive Selection with Docetaxel and Negative Selection with Ganciclovir

The combination of positive and negative selection *in vivo* was done using the same proportions of NP18MDR/TK-GFP cells as in the previous positive selection experiments. S.c. xenografts with 4% or 10% of NP18MDR/TK-GFP cells were established. Once tumors reached 100 to 200 mm^3 , the animals were randomly distributed in four groups (PBS, ganciclovir, docetaxel plus PBS, or docetaxel plus ganciclovir; $n = 10$). Then the animals were treated with PBS or with docetaxel (25 mg/kg ip once every week) for 2 wk in mice with tumors with an initial proportion of 4% NP18MDR/TK-GFP cells or for 3 wk in mice with tumors containing an initial proportion of 10% of modified cells. A control group that did not receive previous docetaxel treatment was treated with ganciclovir (50–75 mg/kg i.p. daily for 18 d). Tumors were measured two or three times weekly, and when they began to regrow and reached 200 to 300 mm^3 the animals were also treated with ganciclovir (50–75 mg/Kg i.p. daily for 18 d). At the end of the experiment some tumors of the docetaxel plus ganciclovir group were excised, and tumor cells were extracted by mechanical disruption and plated. GFP-expressing cells were quantified for each tumor in a fluorescence microscope. Then the cells were plated in 96-well plates (5×10^3 cells/well) and incubated with ganciclovir (10 $\mu\text{g}/\text{mL}$). Cell viability was measured by MTT 6 d after treatment and the percentage of cell viability was determined.

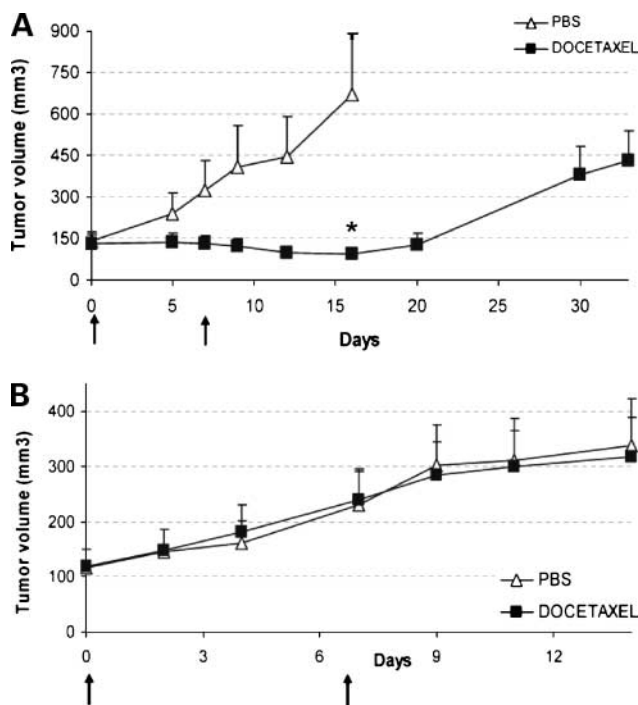


Figure 2. *In vivo* docetaxel sensitivity of NP18 and NP18MDR/TK-GFP cells. **A**, *in vivo* docetaxel sensitivity in NP18 tumors. S.c. xenografts were established by inoculating NP18 cells in nude mice. Once tumors were established, the animals started docetaxel (black squares) or PBS (white triangles) treatment ($n = 8-10$). Arrows, days of docetaxel treatment. Tumor volumes of the docetaxel group and the PBS group are shown. Bars, +SE. **B**, *in vivo* docetaxel sensitivity in NP18MDR/TK-GFP tumors. S.c. xenografts were established as in the experiment above by inoculation with NP18MDR/TK-GFP cells. Once tumors were established, animals started docetaxel (black squares) or PBS (white triangles) treatment ($n = 8-10$). Tumor volumes of the experimental groups are shown. *, statistically significant differences ($P < 0.05$). Bars, +SE.

Results

In vitro Characterization of NP18MDR and NP18MDR/TK-GFP Cells

We generated the NP18MDR/TK-GFP cell line to achieve positive-negative selection of transfected cells. The *MDR* gene was transfected to allow for positive selection with docetaxel and TK to confer sensitivity to ganciclovir. To

facilitate the follow-up of the selected cells, NP18MDR/TK cells were transduced with GFP recombinant retrovirus (NP18MDR/TK-GFP). We first determined the expression of human P-glycoprotein on the cell surface of N18,

NP18MDR, and NP18MDR/TK-GFP cells. FACS analysis shows P-glycoprotein overexpression in NP18MDR and NP18MDR/TK-GFP cells compared with NP18 cells (Fig. 1A).

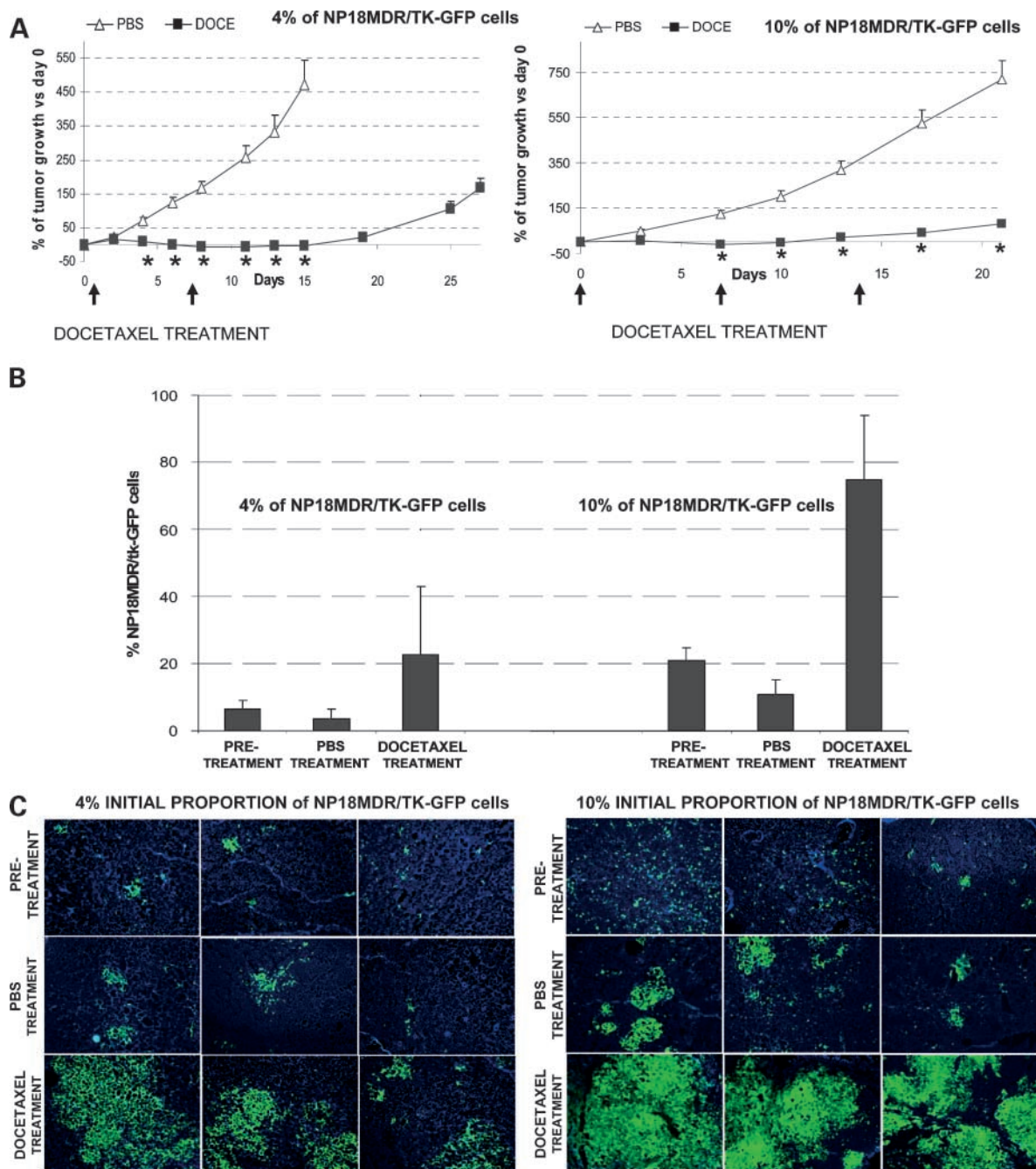
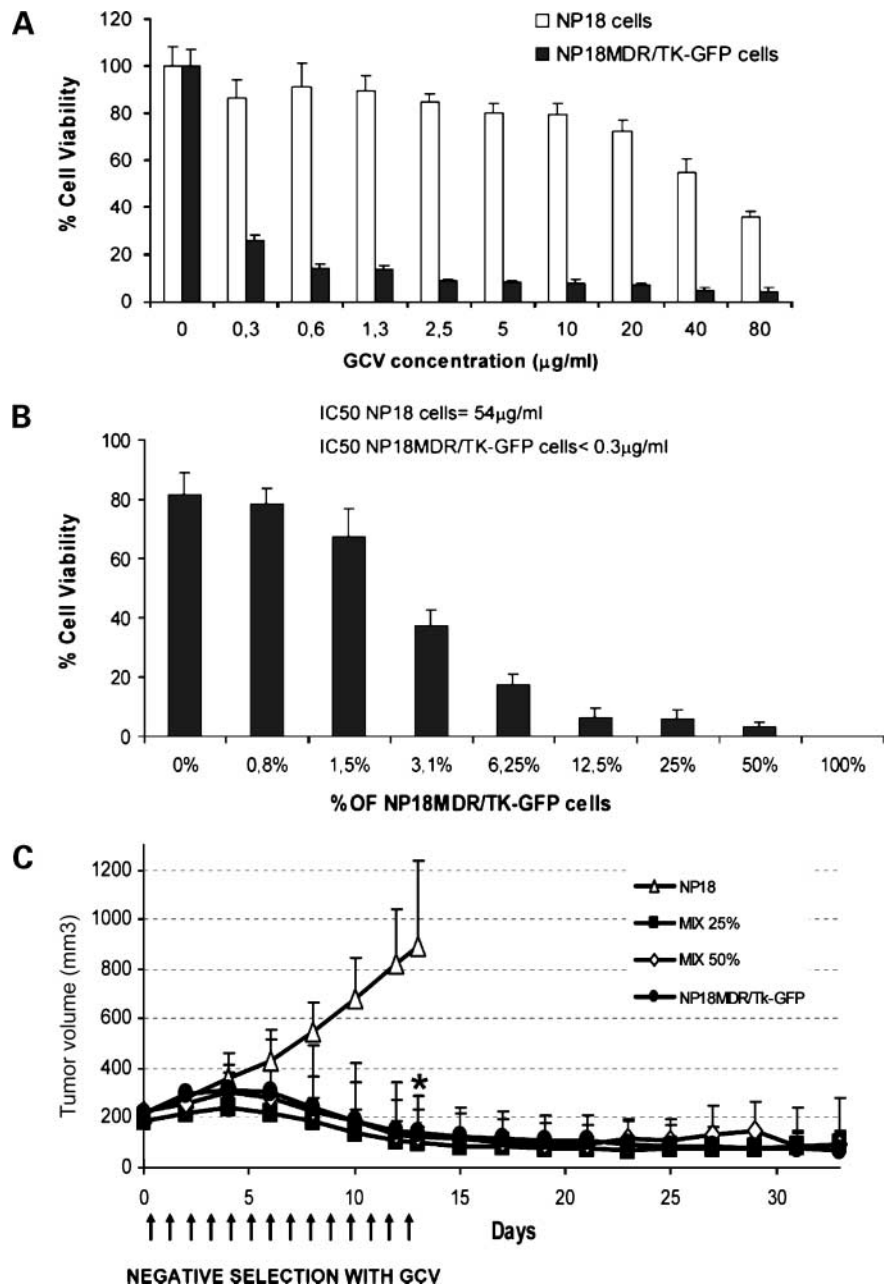


Figure 3. *In vivo* positive selection with docetaxel. **A**, a mixture containing 4% or 10% of NP18MDR/TK-GFP cells and 96% or 90% parental NP18 cells, respectively, were injected s.c. in nude mice. Once tumors were established, the animals were randomly distributed in two groups ($n = 14$): docetaxel (DOCE; black squares) and PBS (white triangles). Docetaxel treatment started when tumors were established. Arrows, days of docetaxel treatment. Tumor growth of the experimental groups is shown. *, statistically significant differences with control group ($P < 0.00001$). Bars, +SE. **B**, increase of NP18MDR/TK-GFP cells in tumors after positive selection with docetaxel. At the beginning of the treatment ($n = 4-6$) and after positive selection with docetaxel ($n = 14$) the animals were sacrificed and tumors were processed for fluorescent microscope. Sections were analyzed and GFP expression was viewed and quantified using a fluorescent microscope. The proportion of GFP cells of experimental groups is shown. Bars, +SD. **C**, three images ($\times 100$) of three representative tumors from each group.

Figure 4. Negative selection with ganciclovir. **A**, *in vitro* ganciclovir sensitivity. NP18 (white bars) and NP18MDR/TK-GFP cells (black bars) were plated in 96-well plates and were incubated with serial dilutions of ganciclovir (0–80 $\mu\text{g}/\text{mL}$). Six days after treatment, cell viability was measured by MTT. The IC_{50} of NP18 and NP18MDR/TK-GFP cells are indicated at the bottom of the figure. Bars, +SD. **B**, *in vitro* bystander effect of NP18MDR/TK-GFP cells with ganciclovir. NP18 and NP18MDR/TK-GFP cells were plated in 96-well plates at different proportions of transfected cells (0, 0.8, 1.5, 3.1, 6.25, 12.5, 25, 50, and 100%) and were incubated with ganciclovir. Six days after treatment, cell viability was measured by MTT. Bars, +SD. **C**, *in vivo* bystander effect of NP18MDR/TK-GFP cells with ganciclovir. S.c. xenografts were established by inoculation of NP18 cells, NP18MDR/TK-GFP cells, or a mixture containing 25% or 50% of NP18MDR/TK-GFP cells and NP18 cells. Once tumors were established, the animals were treated with ganciclovir ($n = 8$). Tumor volume is shown. *, statistically significant differences ($P < 0.05$). Bars, +SE.



To determine if this overexpression of P-glycoprotein conferred docetaxel resistance, an *in vitro* sensitivity experiment to docetaxel was done with parental and modified cell lines and IC_{50} was calculated. The IC_{50} was 23 ng/mL in NP18MDR cells and 28.2 ng/mL in NP18MDR/TK-GFP cells, whereas it was 0.3 ng/mL in parental NP18 cells (Fig. 1B). These results indicate that NP18MDR/TK-GFP cells are 100 times more resistant to docetaxel than NP18 cells and that under docetaxel treatment, modified cells should have a proliferative advantage with respect to NP18 cells (positive selection). NP18 and NP18MDR/TK-GFP cells were treated with different concentrations of other

chemotherapies such as doxorubicine and etoposide, and they also showed a proliferative advantage compared with NP18 cells (data not shown).

***In vitro* and *in vivo* Docetaxel Sensitivity of NP18 and NP18MDR/TK-GFP Cells**

To assess the selective pressure achieved *in vivo* with docetaxel in our NP18 model, we first determined the docetaxel sensitivity of NP18 cells *in vivo*. Mice with NP18-implanted tumors were treated with 25 mg/kg of docetaxel i.p. once every week for 2 weeks and showed statistically significant reduction of tumor size ($P < 0.05$; Fig. 2A). During docetaxel treatment weight loss did not

exceed 10% of body weight, no mice died, and there were no gross signs of toxicity.

To do a preliminary test of the growth advantage of the NP18MDR/TK-GFP cells under selective pressure, we determined whether NP18MDR/TK-GFP cells were resistant to docetaxel *in vivo*. Mice with NP18MDR/TK-GFP tumors were treated with docetaxel, and no reduction of tumor size was observed (Fig. 2B). These preliminary experiments showed that NP18 cells were sensitive to docetaxel and that NP18MDR/TK-GFP cells were resistant. These results suggested that positive selection might be done in mixed tumors with NP18 and NP18MDR/TK-GFP cells.

In vivo Positive Selection with Docetaxel

To allow for positive selection *in vivo*, we established NP18 s.c. tumors containing 4% or 10% of NP18MDR/TK-GFP cells. The animals were distributed randomly in two groups and were given docetaxel or PBS. Tumor growth

in the docetaxel-treated group was statistically lower compared with the control group (Fig. 3A; $P < 0.00001$). The positive selection phase was considered as the period between the beginning of the docetaxel treatment and the time the tumors regrew. During this period, NP18MDR/TK-GFP cells should have a proliferative advantage compared with parental NP18 cells resulting in tumor repopulation by MDR/TK-expressing cells. To evaluate the enrichment of NP18MDR/TK-GFP cells during the positive selection, tumor sections were analyzed by fluorescent microscopy and the percentage of GFP cells was estimated in the tumors of the docetaxel or PBS group (Fig. 3B). A clear enrichment of GFP-positive modified cells upon docetaxel treatment from 4% and 10% until more than 20% and 80%, respectively, was observed, whereas tumors in the PBS group maintained the initial proportion of GFP-expressing cells. Figure 3C shows three images ($\times 100$) of three representative

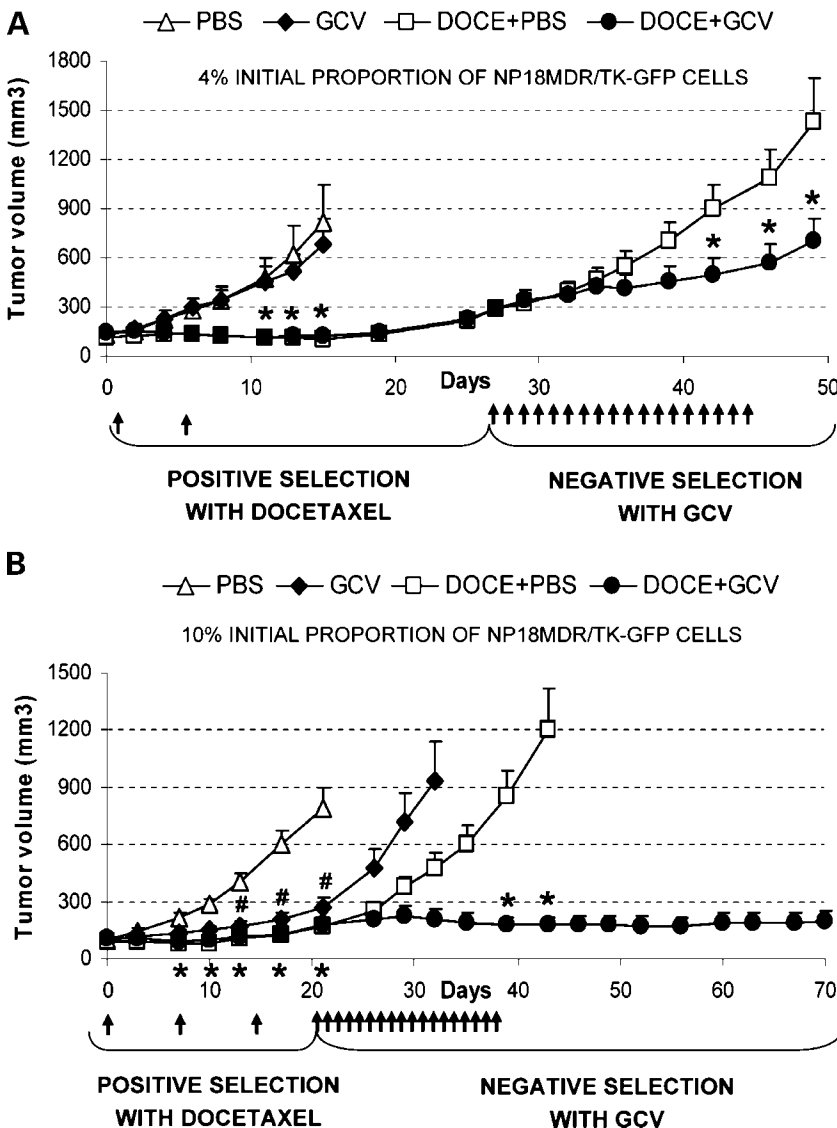


Figure 5. *In vivo* positive and negative selection. **A**, s.c. xenografts were established in nude mice by inoculation of a mixture containing 4% of NP18MDR/TK-GFP cells. Once tumors were established, the animals were randomly distributed in four groups ($n = 10$): PBS (white triangles), ganciclovir (GVC; black diamonds), docetaxel plus PBS (DOCE + PBS; white squares), and docetaxel plus ganciclovir (DOCE + GVC; black spheres). Docetaxel treatment started when tumors were established, and the positive selection phase was considered as the period between the start of the docetaxel treatment and the time the tumors regrew. Arrows, days of docetaxel treatment. Tumor volume is shown. *, statistically significant differences between docetaxel group and PBS group ($P < 0.0004$). After positive selection animals were treated with ganciclovir. #, statistically significant differences between docetaxel plus ganciclovir and docetaxel plus PBS ($P < 0.04$). Bars, +SE. **B**, s.c. xenografts were established in nude mice by inoculation of a mixture containing 10% of NP18MDR/TK-GFP cells. Once tumors were established, the animals were randomly distributed in four groups ($n = 14$): PBS (white triangles), ganciclovir (black diamonds), docetaxel plus PBS (white squares), and docetaxel plus ganciclovir (black spheres). Docetaxel treatment started when tumors were established, and the positive selection phase was considered as the period between the start of the docetaxel treatment and the time when tumors regrew. Arrows, days of docetaxel treatment. Tumor volume is shown. *, statistically significant differences between docetaxel group and PBS group ($P < 0.0004$). A control group was treated only with ganciclovir. #, statistically significant differences between ganciclovir group and PBS group ($P < 0.0006$). After positive selection animals were treated with ganciclovir. *, statistically significant differences between the docetaxel plus ganciclovir group and the docetaxel plus PBS group ($P < 0.0005$). Bars, +SE.

tumors from the pretreated group (animals before docetaxel treatment) compared with three tumors from the docetaxel group (tumors after positive selection) and from the PBS group.

Negative Selection with Ganciclovir

Once positive selection was achieved, the *in vitro* ganciclovir sensitivity of NP18 and NP18MDR/TK-GFP cells was assessed. The NP18MDR/TK-GFP cells were sensitive to ganciclovir ($IC_{50} < 0.3 \mu\text{g/mL}$) whereas the parental NP18 cells were not ($IC_{50} = 54 \mu\text{g/mL}$; Fig. 4A). We observed a slight decrease in cell viability of parental NP18 cells incubated with ganciclovir (concentrations between 0.3 and 20 $\mu\text{g/mL}$). To evaluate the potency of the TK/ganciclovir system a bystander effect experiment was done *in vitro*. More than 60% of the cell culture was eliminated with only 3.1% of NP18MDR/TK-GFP cells in the monolayer; with 12.5% of the modified cells, 90% of the cells were dead (Fig. 4B). These *in vitro* results indicate that NP18MDR/TK-GFP cells could be used for negative selection with ganciclovir. To assess if the proportion of NP18MDR/TK-GFP cells achieved after positive selection (22% and 80% from 4% and 10% initial modified cells, respectively) could eliminate tumors *in vivo*, a bystander effect experiment was done. Mice with implanted tumors containing a mixture of different proportions of NP18MDR/TK-GFP and NP18 cells were treated with ganciclovir. A clear bystander effect was observed in all mixed tumors (50% and 25% NP18MDR/TK-GFP cells; $P < 0.05$; Fig. 4C). During ganciclovir treatment, weight loss did not exceed 10% of body weight, no mice died, and there were no gross signs of toxicity.

This *in vivo* bystander effect experiment showed that the proportion of NP18MDR/TK-GFP cells achieved after positive selection was enough to induce a strong bystander effect on nonmodified NP18 cells and to abrogate tumor growth. We then did a therapy based on positive-negative selection of modified cells.

In vivo Positive and Negative Selection Strategy

To assess the potency of our positive-negative selection therapy we carried out an experiment with the two different proportions of gene-modified cells used in the positive selection experiments. We established NP18 s.c. tumors containing 4% or 10% of NP18MDR/TK-GFP cells. The animals were distributed randomly in groups and were given docetaxel or PBS. As in the positive selection experiments, tumor volume in the docetaxel group was statistically lower compared with the control group (Fig. 5A and B; $P < 0.0004$). After this phase animals were treated with ganciclovir. Ganciclovir treatment should eliminate NP18MDR/TK-GFP cells and induce a bystander effect that leads to the death of surrounding NP18 cells (negative selection). Ganciclovir treatment without a previous positive selection period (ganciclovir group) did not have any therapeutic effect in tumors with an initial proportion of 4% of modified cells. In the experiment with an initial proportion of 10% of modified cells, the tumor volume of the ganciclovir group was statistically different compared with the control group ($P < 0.0006$; Fig. 5B). Despite this early therapeutic effect, tumors of this group began to regrow

at day 22, and the animals were sacrificed at day 32 for ethical reasons. This indicates that 10% of modified cells homogeneously distributed in the tumor were not enough to eliminate all the tumor cells in the absence of a positive selection period. As we expected, the positive selection phase increased the proportion of modified cells in tumors. Upon ganciclovir treatment, this enrichment resulted in a higher therapeutic efficacy (Fig. 5A; $P < 0.04$), allowed an almost complete regression of tumors, and avoided tumor relapse (Fig. 5B; $P < 0.0005$). No additional toxicity was observed associated with combined treatment with docetaxel plus ganciclovir. To understand why tumors did not disappear completely, the remaining cells from tumors after positive and negative selection were extracted and plated from remaining tumors. The proportion of GFP-expressing cells was determined by fluorescence microscopy, and tumors with different proportions of GFP-expressing cells were analyzed. The sensitivity to ganciclovir was tested for different disaggregated tumors, and the results showed that GFP-modified cells remained ganciclovir sensitive (data not shown). Tumors without GFP-expressing cells were also analyzed, and the morphology of the remaining cells suggested that they were fibroblasts (data not shown).

Discussion

Suicide gene therapy efficacy depends on the transduction of a high proportion of tumor cells and a strong bystander effect *in vivo*. Although many groups are improving the delivery vectors [adenovirus (3), retrovirus and cell carriers (22)] and bystander effect of suicide genes (23) to increase their therapeutic effect, the results of clinical trials indicate a need for greater efficacy (24).

We provide proof of principle that a selectable marker such as *MDR1* could be used to compensate the poor gene transfer of suicide genes *in vivo*, allowing an enrichment of modified tumor cells and improving suicide therapy efficacy. In this way, chemoresistant genes could be used for positive selection of suicide gene sensitive cells *in vivo*. Our selectable marker was P-glycoprotein, the *MDR1* gene product, that confers resistance to a variety of chemotherapeutic agents like anthracyclines, vinca alkaloids, epipodophylotoxins, and taxane, but not to gemcitabine and 5-fluorouracil, which are the only agents clinically useful against pancreatic cancer (25). On the contrary, P-glycoprotein increases sensitivity to gemcitabine, which is the current first-line therapy for pancreatic cancer (26). Thus, the use of *MDR1* as a drug selectable marker in this type of cancer may be a reasonable option from a clinical point of view. In addition, multidrug-resistant cells do not show cross-resistance to the TK/ganciclovir system (17), so the *MDR1*/TK combination is safe.

The positive-negative selection strategy was tested in a pancreatic adenocarcinoma model because this tumor type shows a very bad prognosis and new therapeutic strategies need to be explored. The NP18 model (19) represents a tumor that is sensitive to docetaxel treatment. Classic chemotherapies such as docetaxel have been in disuse in

pancreatic cancer because they did not show any benefit in patient survival. However, we expect that the cytotoxic effect of these chemotherapies is sufficient to induce a replacement of tumor cells (9). Our hypothesis is based on the evidence that under chemotherapy, resistant tumor cells replace sensitive cells very efficiently. In a clinical setting, this quick replacement prevents any patient survival improvement, but in our positive selection with docetaxel we aimed to replace chemosensitive tumor cells with ganciclovir-sensitive cells. Moreover, the NP18 tumor model was also sensitive to doxorubicin and etoposide, whereas MDR1/TK cells were resistant to these agents (data not shown). These results suggest that in our NP18 model different chemotherapies could be used to carry out positive selection with the *MDR1* genes. This approach only requires tumors to be sensitive to a drug that is not used in the standard clinical treatment. Hence, this strategy could be done in other types of cancer such as colon, ovarian, lung, prostate, breast, and liver cancers to eliminate acquired chemoresistant tumor cells. Recently, in our laboratory, the positive-negative strategy was also done with dihydrofolate reductase (*DHFR*) as a selectable marker and thymidine kinase as a suicide gene in a colon cancer model (HCT116) partially sensitive to MTX (10).

Upon positive selection with docetaxel starting with 4% and 10% of TK-modified cells, the proportion of TK-modified cells increased 6- to 8-fold, respectively, whereas no enrichment occurred in PBS-treated controls. According to *in vivo* bystander effect experiments mixing cells, tumor growth could be abrogated with a proportion of only 25% of TK-expressing cells in the tumor. After positive selection, we achieved a proportion of 22% of TK-expressing cells from the 4% initial proportion. However, tumor growth could not be abrogated with ganciclovir with such a 22% of modified cells. One explanation could be that the enrichment of TK-expressing cells was not homogeneous in all the tumors compared with the mixing experiments. The enrichment of TK-expressing cells was more homogeneous starting with 10% of NP18MDR1/TK-GFP cells than with 4%. In this experimental setting and after positive and negative selection we could abrogate tumor growth of all the tumors upon ganciclovir treatment.

The positive-negative selection strategy has a precedent in the work of Unger and collaborators (9). A fusion gene of cytosine deaminase (*CD*) and uracil phosphoribosyl transferase (*UPRT*; *FCU1* fusion gene) was used along with *N*-(phosphonacetyl)-*L*-aspartate (PALA) and cytosine to enrich the transduced cells. 5-Fluorocytosine was used as a prodrug for negative selection of transduced cells. Starting from s.c. tumors with a 6% proportion of modified cells, the administration of PALA and cytosine to mice allowed an enrichment of 5-fluorocytosine-sensitive cells and a decreased tumor growth after 5-fluorocytosine treatment. Some differences between our work and such strategy are worth discussing. To confer positive selection the PALA-cytosine strategy required PALA and cytosine to reach the tumor mass. Although high levels of cytosine plasma levels were obtained *in vivo* they decreased very fast. Therefore, the

time frame in which both agents are available limits the ability of cytosine to rescue PALA-induced toxicity. On the other hand, our approach only used one agent for positive selection. Furthermore, although modified cells grew clonally, our strategy resulted in an almost complete replacement of tumor cells by ganciclovir-sensitive cells *in vivo* and in a more effective suicide therapy. In Unger's strategy, *CD* and *UPRT* genes (*FCU1* fusion gene) are involved in both positive and negative selection. A fusion gene confers a safer strategy but precludes the possibility to change the positive selection gene in tumors with an intrinsic resistance to PALA. On the other hand, in our strategy, the use of different genes to confer positive (*MDR1*, dihydrofolate reductase, multidrug resistance protein1) and negative [TK, *FCU* (9), cytochrome P450 2B1 (27), nitroreductase (28)] selection facilitates the change of selectable markers based on the sensitivity and characteristics of the tumor to be treated. For example, *DHFR* confers resistance to MTX, the first-line therapy for lymphomas. There are also numerous reports on the activity of MTX against other types of cancer, albeit their activity has not proven to delay the time to progression or benefit survival of patients and therefore MTX is not used in its clinical management. In these types of cancers positive selection with MTX could be done to enrich *DHFR*/suicide gene cells. The efficacy of the TK/ganciclovir system is associated with gap junctions (29) and the number of gap junctions depends on the tumor type (30). Therefore, suicide genes such as *FCU*, cytochrome P450, or nitroreductase that do not depend on cell-cell contact for exporting cytotoxic agents can be used for negative selection in tumor types with low levels of gap junctions such as colorectal carcinomas (30). Despite the gap junction dependence, the TK/ganciclovir system is still a powerful tool in gene therapy. *TK* is the reporter gene most commonly used in current molecular imaging studies that use positron emission tomography (31). Therefore, distribution and enrichment of TK-expressing cells in the tumor could be easily monitored in a noninvasive manner. Moreover, to confer a safer strategy, the *TK* gene can also be used as a fusion gene with selectable genes such as *DHFR* (32).

One of the risks of using drug selectable markers is the possible silencing or inactivation of the negative-selection gene expression. In this case, we would have undesirable chemoresistant tumor cells. In our experiments we could not eliminate all tumor cells upon ganciclovir treatment. One possible explanation is related to the mechanism of cell death induced by the TK/ganciclovir system. This system requires cell replication to inhibit DNA synthesis and kill the transduced cells (3). GFP-expressing tumor cells were obtained from the remaining tumors of ganciclovir-treated mice and we confirmed that they maintained ganciclovir sensitivity *in vitro*. These results suggest that GFP-expressing cells were quiescent in ganciclovir-treated mice. Tumors composed of fibroblasts and connective tissue but without apparent GFP-expressing cells were also obtained from tumors of ganciclovir-treated mice. The replacement of tumor cells by fibroblasts may induce a misleading interpretation of the response to the treatment.

We have proved here the concept that a drug resistance gene can be used to enrich suicide gene-expressing cells in a tumor. Our next main challenge is to transfer the *MDR1/TK* construct to tumor cells and transduce them stably at a level of 10% of transfection. Reasonable options to transport these genes are episomal plasmids (33), adeno-transposons, sleeping beauty transposons (34), and liposomes (35). Vector transduction could be also done with lentiviral or adenoassociated vectors.

In conclusion, the current study proposes a novel strategy to enrich suicide gene-expressing cells in the tumor mass and improve the efficacy of suicide therapies.

Disclosure of Potential Conflicts of Interest

No potential conflicts of interest were disclosed.

Acknowledgments

We thank Blanca Luena for her technical assistance in animal experiments, and Juanjo Rojas Exposito, Sonia Guedan, Marta Gimenez, Raúl Gil, Pancho Alcayaga, Miguel Camacho, Cristina Puig, and Eduard Laborda for their technical assistance in laboratory techniques.

References

- Konig J, Hartel M, Nies AT, et al. Expression and localization of human multidrug resistance protein (ABCC) family members in pancreatic carcinoma. *Int J Cancer* 2005;115:359–67.
- Hutterer M, Günsilius E, Stockhammer G. Molecular therapies for malignant glioma. *Wien Med Wochenschr* 2006;156:351–63.
- Fillat C, Carrio M, Cascante A, Sangro B. Suicide gene therapy mediated by the herpes simplex virus thymidine kinase gene/ganciclovir system: fifteen years of application. *Curr Gene Ther* 2003;3:13–26.
- Freeman SM, Abboud CN, Whartenby KA, et al. The “bystander effect”: tumor regression when a fraction of the tumor mass is genetically modified. *Cancer Res* 1993;53:5274–83.
- Cascante A, Huch M, Rodriguez LG, Gonzalez JR, Costantini L, Fillat C. Tat8-TK/GCV suicide gene therapy induces pancreatic tumor regression *in vivo*. *Hum Gene Ther* 2005;16:1377–88.
- Smitt PS, Driessse M, Wolbers J, Kros M, Avezaat C. Treatment of relapsed malignant glioma with an adenoviral vector containing the herpes simplex thymidine kinase gene followed by ganciclovir. *Mol Ther* 2003;7:851–8.
- Kucerova L, Altanerova V, Matuskova M, Tyciakova S, Altaner C. Adipose tissue-derived human mesenchymal stem cells mediated prodrug cancer gene therapy. *Cancer Res* 2007;67:6304–13.
- Fritz V, Jorgensen C. Mesenchymal stem cells: an emerging tool for cancer targeting and therapy. *Curr Stem Cell Res Ther* 2008;3:32–42.
- Unger MM, Wahl J, Ushmorov A, et al. Enriching suicide gene bearing tumor cells for an increased bystander effect. *Cancer Gene Ther* 2007;14:30–8.
- Martinez-Quintanilla J, Cascallo M, Fillat C, Alemany R. Antitumor Therapy Based on Cellular Competition. *Hum Gene Ther* 2009;20:728–38.
- Rougier P, Adenis A, Ducreux M, et al. A phase II study: docetaxel as first-line chemotherapy for advanced pancreatic adenocarcinoma. *Eur J Cancer* 2000;36:1016–25.
- Liu B, Staren ED, Iwamura T, Appert HE, Howard JM. Mechanisms of taxotere-related drug resistance in pancreatic carcinoma. *J Surg Res* 2001;99:179–86.
- Biedler JL, Riehm H. Cellular resistance to actinomycin D in Chinese hamster cells *in vitro*: cross-resistance, radioautographic, and cytogenetic studies. *Cancer Res* 1970;30:1174–84.
- Lu Z, Kleeff J, Shrikhande S, et al. Expression of the multidrug-resistance 1 (MDR1) gene and prognosis in human pancreatic cancer. *Pancreas* 2000;21:240–7.
- Zalatnai A. P-glycoprotein expression is induced in human pancreatic cancer xenografts during treatment with a cell cycle regulator, mimosine. *Pathol Oncol Res* 2005;11:164–9.
- D'Hondt V, Symann M, Machiels JP. Chemoprotection and selection by chemotherapy of multidrug resistance-associated protein-1 (MRP1) transduced cells. *Curr Gene Ther* 2001;1:359–66.
- Sugimoto Y, Hrycyna CA, Aksentjevich II, Pastan II, Gottesman MM. Coexpression of a multidrug-resistance gene (MDR1) and herpes simplex virus thymidine kinase gene as part of a bicistronic messenger RNA in a retrovirus vector allows selective killing of MDR1-transduced cells. *Clin Cancer Res* 1995;1:447–57.
- Schondorf T, Neumann R, Benz C, et al. Cisplatin, doxorubicin and paclitaxel induce *mdr1* gene transcription in ovarian cancer cell lines. *Recent Results Cancer Res* 2003;161:111–6.
- Villanueva A, Garcia C, Paules AB, et al. Disruption of the antiproliferative TGF-beta signaling pathways in human pancreatic cancer cells. *Oncogene* 1998;17:1969–78.
- Petritz J, Gottesman MM, Aran JM. An MDR-EGFP gene fusion allows for direct cellular localization, function and stability assessment of P-glycoprotein. *Curr Drug Deliv* 2004;1:43–56.
- Ishida Y, Ohtsu T, Hamada H, et al. Multidrug resistance in cultured human leukemia and lymphoma cell lines detected by a monoclonal antibody, MRK16. *Jpn J Cancer Res* 1989;80:1006–13.
- Kucerova L, Matuskova M, Pastorakova A, et al. Cytosine deaminase expressing human mesenchymal stem cells mediated tumour regression in melanoma bearing mice. *J Gene Med* 2008;10:1071–82.
- Erbs P, Findeli A, Kintz J, et al. Modified vaccinia virus Ankara as a vector for suicide gene therapy. *Cancer Gene Ther* 2008;15:18–28.
- Varghese S, Rabkin SD. Oncolytic herpes simplex virus vectors for cancer virotherapy. *Cancer Gene Ther* 2002;9:967–78.
- Chua YJ, Cunningham D. Chemotherapy for advanced pancreatic cancer. *Best Pract Res Clin Gastroenterol* 2006;20:327–48.
- Bergman AM, Pinedo HM, Veerman G, Kuiper CM, Peters GJ. Increased sensitivity to gemcitabine of P-gP and MRP overexpressing human non-small cell lung cancer cell lines. *Adv Exp Med Biol* 1998;431:591–4.
- Carrio M, Visa J, Cascante A, Estivill X, Fillat C. Intratumoral activation of cyclophosphamide by retroviral transfer of the cytochrome P450 2B1 in a pancreatic tumor model. Combination with the HSVtk/GCV system. *J Gene Med* 2002;4:141–9.
- Denny WA. Prodrugs for gene-directed enzyme-prodrug therapy (suicide gene therapy). *J Biomed Biotechnol* 2003;2003:48–70.
- Andrade-Rozental AF, Rozental R, Hopperstad MG, Wu JK, Vronis FD, Spray DC. Gap junctions: the “kiss of death” and the “kiss of life”. *Brain Res Brain Res Rev* 2000;32:308–15.
- Burrows FJ, Gore M, Smiley WR, et al. Purified herpes simplex virus thymidine kinase retroviral particles: III. Characterization of bystander killing mechanisms in transfected tumor cells. *Cancer Gene Ther* 2002;9:87–95.
- Schaller BJ, Cornelius JF, Sandu N, Buchfelder M. Molecular imaging of brain tumors personal experience and review of the literature. *Curr Mol Med* 2008;8:711–26.
- Mayer-Kuckuk P, Banerjee D, Malhotra S, et al. Cells exposed to antifolates show increased cellular levels of proteins fused to dihydrofolate reductase: a method to modulate gene expression. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2002;99:3400–5.
- Papapetrou EP, Ziros PG, Micheva ID, Zombos NC, Athanassiadou A. Gene transfer into human hematopoietic progenitor cells with an episomal vector carrying an S/MAR element. *Gene Ther* 2006;13:40–51.
- Liu H, Visner GA. Applications of Sleeping Beauty transposons for nonviral gene therapy. *IUBMB Life* 2007;59:374–9.
- Reszka RC, Jacobs A, Voges J. Liposome-mediated suicide gene therapy in humans. *Methods Enzymol* 2005;391:200–8.

Por cuestiones de formato dictadas desde el departamento de “Biología Celular, Inmunología i Neurociències” el apartado de **Resultados** de esta tesis doctoral sólo puede constar de la información publicada en forma de artículos científicos. Para poder incluir los resultados todavía no publicados, hemos creado un apartado anexo. En el **ANEXO II**, se muestran los resultados referentes al uso de células madre y a la selección positiva de este tipo celular en tumores después del tratamiento con una droga de selección.

En el **ANEXO I** se especifican las técnicas utilizadas para realizar dichos experimentos.

DISCUSIÓN GENERAL

1. Justificación de la selección de células modificadas con genes suicidas

La eficacia de la terapia génica suicida depende de la transducción de una proporción elevada de células tumorales y de un potente efecto colateral *in vivo*. A pesar de las mejoras enfocadas a incrementar la llegada de los genes suicidas a las células tumorales con vectores más eficientes o a aumentar el efecto colateral, las respuestas obtenidas en los ensayos clínicos con genes suicidas han sido muy modestas.¹¹⁵

Para aumentar el porcentaje de células modificadas con genes suicidas en el tumor, nos propusimos conferir una ventaja selectiva a dichas células. Esta ventaja se podía conseguir mediante oncogenes, que aportasen una ventaja proliferativa a las células modificadas¹⁴⁵, o mediante genes de resistencia a drogas, que protegieran estas células de una droga de selección. Esta última opción nos pareció la más segura y fue la que utilizamos en la presente tesis. Los genes de resistencia a drogas han sido ampliamente utilizados para proteger a los precursores de la médula ósea de los efectos tóxicos de las altas dosis de quimioterapia.¹⁵⁵ Esta quimioprotección induce, de forma indirecta, un enriquecimiento de las células modificadas que permite reconstituir la médula ósea durante el período de selección. Ciertos grupos han aprovechado este enriquecimiento *in vivo* para aumentar el número células modificadas con genes terapéuticos.^{166, 224, 225} Existen numerosas enfermedades como la β -talasemia o la enfermedad granulomatosa crónica que requieren de un gran número de células modificadas genéticamente para poder revertir la enfermedad. El diseño de vectores que expresen un marcador de selección junto con el gen terapéutico podría ayudar a corregir estas enfermedades genéticas.²²⁵⁻²²⁸

En esta tesis doctoral se presenta, por primera vez, la utilización de los genes de resistencia a drogas como marcadores de selección para enriquecer las células tumorales modificadas con genes suicidas, y mejorar así la eficacia de la terapia génica suicida después de la administración de la prodroga. El diseño de una estrategia de selección positiva-negativa depende de varios factores.

- a) El tipo de tumor a tratar: los tumores candidatos deben ser neoplasias con mal pronóstico en las que la primera línea de tratamiento no sea eficaz.
- b) El gen de selección: dicho gen ha de conferir resistencia a un compuesto que no se utilice en la práctica clínica de ese tipo de tumor.

c) La droga de selección: sugerimos utilizar agentes antitumorales que inducen una respuesta inicial después de su administración en pacientes, pero que, al no ofrecer un aumento en la esperanza de vida de dichos pacientes, son descartados de la clínica.

d) El sistema suicida: la elección del gen de selección negativa depende de las características del tumor a tratar, entre las que destacamos los niveles de uniones *gap*.

e) El sistema para introducir los genes de selección en las células tumorales: en el **apartado 5** de esta discusión se sugieren diversos vectores de transferencia génica que podrían ser utilizados para introducir los genes de selección en las células tumorales.

En los siguientes dos apartados, mostramos la prueba de concepto de la selección positiva-negativa mediante dos aproximaciones con tipos de tumor y genes de selección diferentes.

2. Selección positiva-negativa de células tumorales modificadas con los genes DHFR y TK

En esta primera aproximación, escogimos el cáncer colorrectal como tumor a tratar porque es una de las enfermedades neoplásicas más comunes en los países desarrollados.²²⁹ A pesar de la mejora de los programas de diagnóstico del cáncer colorrectal, aproximadamente el 20% de los pacientes presentan metástasis durante el desarrollo de la enfermedad.²³⁰ El 5-fluorouracilo (5-FU), en combinación con leucovorina, oxaliplatino o irinotecan (FOLFOX o FOLFIRI) es la quimioterapia más efectiva para este tipo de tumor.²³¹ Aún así, son necesarias altas dosis de quimioterapia para inducir una respuesta terapéutica, lo que implica la frecuente aparición de efectos secundarios graves. Además, a pesar de su efecto terapéutico inicial, frecuentemente se generan recidivas refractarias al tratamiento que acaban causando la muerte del paciente. Por este motivo, se requiere el desarrollo de nuevas estrategias para el tratamiento de dicha enfermedad.

Entre las terapias experimentales, el sistema suicida TK/GCV ha mostrado eficacia en el tratamiento del cáncer colorrectal. En un modelo murino, la presencia en el tumor de un 9% de células modificadas con el gen de la TK induce regresiones completas después de administrar el GCV.²³² Sung y colaboradores utilizaron, por primera vez, el sistema TK/GCV para el tratamiento de metástasis hepáticas en pacientes con adenocarcinoma colorrectal.¹²⁷ Esta estrategia no mostró efectos tóxicos graves y permitió la estabilización de la enfermedad en 11 de los 16 pacientes, mostrando así un efecto beneficioso de esta terapia sobre este tipo de tumor.¹²⁷

Para mejorar la eficacia del sistema TK/GCV en este tipo de tumor, nos planteamos aplicar la selección positiva-negativa. Para ello, modificamos la línea de cáncer de colon humano HCT116

con un marcador de selección y con el gen de la TK. Esta línea fue escogida por presentar una sensibilidad parcial al compuesto MTX. Por este motivo, elegimos como marcador de selección, el gen de resistencia DHFR, que confiere resistencia a antifolatos, entre los que encontramos el MTX y el trimetrexato (TMTX). Con la finalidad de obtener una mayor resistencia al MTX utilizamos el doble mutante Phe22-Ser31 del gen DHFR, que posee una afinidad reducida por dicha droga.^{13, 233} La ventaja del uso de la DHFR respecto a otros genes de resistencia como la MGMT es que los agentes utilizados para la selección *in vivo* (MTX o TMTX) no son genotóxicos, mientras que los compuestos usados para la selección con el MGMT (carmustina o BCNU y temozolomida o TMZ) sí que lo son. Una de las principales limitaciones de los antifolatos como agentes de selección es su ineficacia para eliminar células arrestadas. Aún así, la gran mayoría de las células tumorales están en división y, por lo tanto, pueden ser eliminadas mediante el tratamiento con antifolatos. Por otro lado, el gen DHFR ha sido utilizado para quimiproteger la médula ósea y ha mostrado un enriquecimiento de las HSC modificadas después del tratamiento con MTX¹⁵⁸. Estos estudios indican que este gen es un buen candidato como marcador de selección para enriquecer una población modificada con un gen suicida.

El MTX fue escogido como droga de selección porque, a pesar de estar indicado como primera línea de tratamiento en varios tipos de tumores²³⁴, no se utiliza en tumores colorrectales. Los estudios publicados por Balaban y colaboradores indican que la adición del agente MTX no mejora los índices de respuesta clínica de los pacientes con carcinoma colorrectal avanzado, en comparación con el tratamiento único de 5-FU.²³⁵ Esta falta de eficacia clínica es debida a una rápida adaptación del tumor a este compuesto que hace que no se observe un beneficio terapéutico a largo plazo. A pesar de ello, esta droga es capaz de inducir un efecto citotóxico a corto plazo sobre las células del tumor²³⁶⁻²³⁸, que podría ser utilizado para seleccionar positivamente las células modificadas genéticamente.

Por otro lado, el gen suicida TK salvaje fue escogido como marcador de selección negativa debido a la gran experiencia preclínica y clínica que se posee sobre él. Además, dicho gen ayuda a incrementar la resistencia al MTX, inducida por el DHFR, gracias a su papel en la síntesis de timidina monofosfato *de novo*.²³⁹ El uso de genes suicidas con un efecto colateral independiente de uniones *gap*^{87, 90, 97, 103}, o mutantes del gen TK salvaje⁷⁰, con una sensibilidad superior a GCV, hubiese mejorado la eficacia de la selección negativa. Sin embargo, la finalidad de esta prueba de concepto era evaluar la mejora terapéutica proporcionada por la preselección de las células modificadas y, para determinar esta diferencia, consideramos que era más apropiado el uso de un sistema suicida que no eliminase los tumores por sí solo.

La estrategia de selección positiva-negativa se basa en la expresión de los dos marcadores de selección en la misma célula. En este trabajo, esta coexpresión se aseguró mediante la fusión del gen de la DHFR con el gen de la TK. A su vez, también es necesaria la expresión estable de ambos genes durante todo el período de selección positiva. Este período se extiende desde el inicio del tratamiento con la droga de selección hasta la aparición de resistencias a dicha droga o la disminución de su eficacia. Para garantizar esta persistencia, el producto génico DHFR/TK fue clonado en un plásmido episomal llamado pEPI. Este plásmido contiene un origen de replicación eucariota bajo un promotor potente (SV40) y unas regiones humanas de anclaje a la matriz nuclear (S/MAR).⁴⁶ Estas secuencias S/MAR se unen específicamente a la proteína SAF-A²⁴⁰, una de las principales proteínas de la matriz nuclear, y son necesarias para la replicación extracromosómica y la segregación del plásmido pEPI a las células hijas.⁴⁶ La transfección del plásmido pEPI-DHFR/TK sobre las células HCT116 y la selección con MTX dio lugar a la población de células modificadas. En presencia de la droga de selección, estas células se enriquecieron a expensas de la muerte de las células tumorales parentales. En concreto, a partir de un 0,1% de células modificadas pasamos a un 90% después de 35 días de selección *in vitro*, un enriquecimiento más que considerable.¹⁵ En cambio, en ausencia de selección, dichas células no mostraron diferencias de crecimiento en comparación con sus parentales. La aplicación de esta droga de selección en un modelo murino con tumores mixtos nos permitió enriquecer la población de células modificadas con genes suicidas.¹⁵ No obstante, este enriquecimiento *in vivo* fue inferior al observado *in vitro*. Aún así, pudimos conseguir proporciones de un 15% de células modificadas a partir de un 1% inicial.¹⁵

Por otro lado, las células modificadas presentaron sensibilidad a GCV. Sin embargo, la presencia de células parentales en cultivos mixtos después del tratamiento con la prodroga, nos indicó la falta de efecto colateral en este modelo.¹⁵ La mezcla de células HCT116DHFR/TK con células HCT116, a diferentes proporciones, tratadas con GCV, nos confirmó que las células modificadas eran incapaces de inducir la muerte de las células parentales (datos no presentados en esta tesis). Además, los tumores formados por un 50% de cada una de las poblaciones continuaron creciendo después del tratamiento con GCV¹⁵, lo que confirmaba una vez más la ausencia de efecto colateral en este modelo *in vivo*.

A pesar de esta gran limitación, la selección positiva de tumores mixtos con MTX y el posterior tratamiento con GCV generó una respuesta antitumoral superior a la obtenida con la terapia génica suicida *per se*. Los tumores con un 1% de células modificadas presentaron una disminución del crecimiento tumoral después de la selección positiva-negativa.¹⁵ Pese a esto, el efecto terapéutico no fue significativo, lo que indicaba que, a pesar de enriquecer la población inicial hasta un 15%, esta proporción no era suficiente para generar respuestas significativas en este tipo de tumor después de la administración de GCV. Al aumentar la proporción inicial de

células modificadas hasta un 6%, la estrategia de selección positiva-negativa disminuyó el crecimiento tumoral en comparación con los controles.¹⁵ Sin esta estrategia de enriquecimiento, sería necesario modificar un porcentaje de células superior al 6% para obtener respuestas significativas *in vivo*.^{15, 117} A pesar de esta mejora terapéutica, no pudimos eliminar por completo los tumores. Existen diversos factores que podrían explicar estos resultados.

En primer lugar, el tratamiento con MTX incrementó la proporción de las células modificadas con genes suicidas en el tumor. Sin embargo, esta selección positiva no permitió el reemplazamiento total de las células del tumor. En nuestros experimentos de selección positiva, pudimos aumentar la población de células modificadas de un 1% a un 15%. A pesar de este enriquecimiento considerable, esta proporción final fue insuficiente para eliminar estos tumores después del tratamiento con GCV. Posiblemente, dosis más elevadas de MTX hubiesen aumentado la eficiencia de la selección positiva. Aún así, el uso de dosis de 50 mg/kg de MTX limitaba la administración una vez por semana y acababa ofreciendo menos eficacia (datos no presentados en esta tesis). Por este motivo, en el presente trabajo, escogimos una dosis fraccionada de 9 mg/kg tres veces a la semana, que era más eficaz y menos tóxica que las otras pautas testadas. A pesar de usar la pauta de dosis más efectiva, sólo pudimos obtener una reducción del 15% del crecimiento de los tumores HCT116 después de 17 días de tratamiento.

En segundo lugar, la alta tasa de crecimiento de la línea HCT116 limitaba el período de selección positiva. Líneas tumorales con un crecimiento menor permitirían un reemplazamiento mayor de las células modificadas.

En tercer lugar, a pesar de la distribución homogénea de las células modificadas antes del tratamiento, dichas células crecieron de forma clonal durante la selección positiva con MTX. Esta distribución heterogénea por grupos no permitió una selección negativa eficaz. Además, los tumores con un 1% de células modificadas iniciales también mostraron una selección positiva variable entre tumores. Esta heterogeneidad dentro del mismo grupo no fue tan acusada en los tumores con un 6% de células iniciales.

En cuarto lugar, las células HCT116 modificadas con el gen de la TK mostraron sensibilidad a GCV, tanto *in vitro* como *in vivo*.¹⁵ Aún así, este modelo celular presentó un efecto colateral muy reducido. Estos resultados están en relación con los bajos niveles de uniones *gap* que expresa esta línea celular.⁷¹ La presencia de estas uniones es necesaria para la transferencia de los metabolitos tóxicos de una célula tumoral que expresa el gen suicida a otra célula tumoral adyacente que no lo expresa. Para mejorar el efecto colateral del sistema TK/GCV en líneas con bajos niveles de uniones *gap* se podría incorporar al gen de la TK un dominio de transducción de

proteínas. Estos dominios permitirían la difusión pasiva de la proteína TK entre célula y célula. Entre estos dominios, el tat⁷² y el VP22⁷³ han demostrado la capacidad de transferir la proteína TK a células que no expresan uniones *gap*, mejorando así su efecto colateral. Otra aproximación sería la coexpresión de la conexina 43, principal componente de las uniones *gap*, junto con el gen de la TK, para facilitar la formación de este tipo de uniones.⁷⁴ Aún así, la estrategia de selección positiva-negativa depende de la expresión de los dos genes de selección en una misma célula. La adición de un tercer gen dificultaría la aplicabilidad de esta estrategia. Una mejor opción podría ser la estimulación farmacológica de la expresión de esta conexina con compuestos como el n-butilato⁷⁵ y la hidroxurea⁷⁶ o drogas como la apigenina y la lovastatina⁷⁷. En concreto, a partir de tumores con un 10% de células modificadas con el gen de la TK, la lovastatina o la apigenina duplican la respuesta antitumoral del GCV. La principal limitación de esta estrategia es que sólo permite aumentar la expresión de conexinas en células que ya tienen una expresión basal de dicha proteína. Así pues, no sería efectivo en células que no expresan ciertos niveles de conexinas.

Por otro lado, el uso de genes suicidas con un efecto colateral independiente de uniones *gap*, como la CD o el gen de fusión FCU, mejoraría la selección negativa del modelo HCT116. Además, el uso de estos genes permitiría sintetizar en el tumor los metabolitos tóxicos del 5-FU, el compuesto quimioterapéutico más efectivo en el cáncer de colon.²³¹ En concreto, el sistema CD/5-FC ha sido utilizado en modelos murinos con tumores colorectales y ha mostrado regresiones tumorales con sólo un 2% de las células transducidas en el tumor.²⁴¹ Por otro lado, la combinación de la CD con el gen UPRT ha demostrado un aumento en la sensibilidad a 5-FC de más de 10 veces en la línea de cáncer de colon HT29.²⁴² A su vez, Koyama y colaboradores demostraron que la administración intratumoral de un vector adenoviral que contenía dichos genes suprimía el crecimiento tumoral en un modelo murino después del tratamiento con 5-FC.²⁴² Además de su eficacia en la preclínica, la terapia génica suicida con el gen CD ha sido bien tolerada en la clínica. Crystal y colaboradores realizaron la primera aproximación clínica en pacientes con carcinoma de colon metastático mediante la inyección intratumoral de un vector adenoviral que contenía el gen de la CD en combinación con la administración oral de 5-FC.²⁴³ ²⁴⁴ Este estudio de fase I determinó la seguridad de este sistema suicida. Aún así, no se observaron ni aumentos en la supervivencia de los pacientes tratados ni respuestas clínicas.²⁴⁴ Es necesario realizar nuevos estudios para determinar la eficacia terapéutica de este sistema en la clínica.

En quinto lugar, todos los experimentos *in vivo* presentados en esta tesis se han realizado en el modelo murino inmunodeprimido BalbC nu/nu. Este tipo de animales permiten la implantación de tumores humanos sin que se produzca un rechazo. Sin embargo, este modelo presenta una desventaja que condiciona la eficacia de los sistemas suicidas. La aplicación de la terapia génica

suicida en ratones inmunocompetentes ha permitido determinar un efecto colateral a distancia. Dicho efecto es mediado por el sistema inmune y aumenta la eficacia de la terapia génica suicida.⁵⁹⁻⁶¹ Agard y colaboradores evaluaron y caracterizaron este efecto colateral a distancia en un modelo de rata con dos tumores colorrectales implantados en dos lóbulos hepáticos distantes.⁶⁰ Sólo uno de los dos tumores fue transducido con un vector adenoviral portador del gen de la TK. A pesar de ello, después de la administración de GCV, se produjo una regresión tanto en el tumor tratado como en el no tratado. Los análisis inmunohistoquímicos mostraron la presencia de linfocitos CD8⁺ en las lesiones distantes y la depleción previa de estos linfocitos impidió la generación de este efecto colateral a distancia.⁶⁰ Estos resultados indican que el efecto terapéutico observado en nuestro modelo inmunodeprimido es inferior al que esperaríamos en un modelo inmunocompetente.

3. Selección positiva-negativa de células tumorales modificadas con los genes MDR1 y TK

Con tal de mejorar los resultados obtenidos con el sistema DHFR/TK, optamos por cambiar el gen de selección DHFR por el gen de resistencia a multidroga MDR1 y aplicar la selección positiva-negativa en el modelo de adenocarcinoma pancreático humano NP18. Se escogió este tipo de tumor porque presenta un pronóstico sumamente desfavorable en la clínica. Este mal pronóstico se debe a la frecuente presencia de metástasis en el momento del diagnóstico y a la ausencia de terapias efectivas para su tratamiento. La quimioterapia de elección para este tipo de tumor es la gemcitabina como monoterapia o en combinación con el 5-FU.^{245, 246} A pesar de ser ampliamente utilizado, este tratamiento sólo permite alargar unos meses la esperanza de vida de los pacientes y es necesaria el uso de una segunda y tercera línea de tratamiento.²⁴⁷

La terapia génica y, en concreto, la terapia génica con genes suicidas ha sido propuesta como tratamiento experimental para el adenocarcinoma pancreático humano.^{121, 248-250} Esta terapia ha mostrado resultados prometedores tanto en ratones atímicos como en modelos inmunocompetentes. El grupo de la doctora Cristina Fillat, experta en el sistema suicida TK/GCV, lleva trabajando desde hace muchos años en el tratamiento de este tipo de tumor. Una de sus primeras aproximaciones fue la utilización de células productoras de vectores retrovirales que expresaban el gen de la TK (PA317-TK) para la administración intratumoral en un modelo murino. Este tratamiento permitió la reducción significativa del tamaño tumoral y la remisión completa de algunos tumores.²⁴⁹ Otra estrategia utilizada por este grupo fue la fusión del gen de la TK al dominio de transducción de proteínas tat8 (tat8-TK) para mejorar el efecto colateral del sistema. La aplicación local del gen tat8-TK, mediante vehículos celulares o adenovirus replicativos, redujo más del 50% del volumen tumoral respecto a los controles.^{72, 121} A pesar de estos resultados esperanzadores, en la mayoría de los casos, esta terapia sólo ha conseguido un

retraso en la progresión tumoral, siendo la remisión completa de los tumores un evento poco frecuente. La principal limitación del éxito de este tratamiento está relacionada con el número de células que son modificadas con los vectores de transferencia. Para aumentar este número, proponemos enriquecer las células tumorales transducidas mediante la expresión de un gen de resistencia a drogas y la administración de una droga de selección.

Como marcador de selección utilizamos el gen MDR1. Este gen codifica para una bomba de flujo llamada glicoproteína P (Pgp). A diferencia del gen de la DHFR, la Pgp induce resistencia a una gran variedad de compuestos entre los que encontramos el docetaxel²⁵¹, pero no induce resistencia ni a gemcitabina ni a 5-FU, los únicos compuestos clínicamente útiles en el tratamiento del cáncer de páncreas. Al contrario de lo esperado, Jensen y colaboradores observaron un aumento de la sensibilidad a gemcitabina en tumores de cáncer de pulmón de célula pequeña con una sobreexpresión de la Pgp.²⁵² Siguiendo estos resultados, Bergman y colaboradores testaron la sensibilidad a gemcitabina en un panel de líneas tumorales humanas de melanoma, cáncer de pulmón de célula no pequeña, cáncer de pulmón de célula pequeña, carcinoma epidermoide y cáncer de ovario, todas ellas con una sobreexpresión del gen MDR1. Los resultados mostraron que estas células eran de 9 a 72 veces más sensibles a gemcitabina que sus homólogos parentales. Además, este aumento en la sensibilidad a dicha droga revertía al tratar con verapamilo, un inhibidor de la Pgp.²⁵³ En conjunto, estos resultados indican que el uso del gen MDR1 como marcador de selección en los tumores pancreáticos es una opción razonable desde un punto de vista clínico.

En combinación con el gen MDR, el docetaxel se escogió como droga de selección para enriquecer la población celular modificada con un gen suicida. Este agente quimioterapéutico está indicado para el tratamiento de cinco tipos de tumores (cáncer de mama, cáncer de pulmón de célula no pequeña, cáncer de próstata, adenocarcinoma gástrico y cáncer de cabeza y cuello).²⁵⁴⁻²⁵⁸ Sin embargo, el docetaxel no se utiliza en la práctica clínica del cáncer de páncreas porque la combinación de dicho compuesto con la primera línea de tratamiento no ofrece ningún beneficio clínico en los pacientes.²⁵⁹ Aún así, esta droga presenta una eficacia antitumoral en modelos preclínicos con tumores BxPC3, NP31, MiaPaca2 y NP18, todos ellos de origen pancreático. Además, se ha demostrado que el docetaxel ejerce un efecto citotóxico sobre las células tumorales de los pacientes con cáncer de páncreas^{260, 261}, aunque no repercute en una respuesta clínica a largo plazo. En este caso, la aplicación de la selección positiva-negativa permitiría enriquecer las células modificadas con genes suicidas en el tumor mediante una estrategia segura, que induciría resistencia a una droga en desuso en este tipo de tumor.

Para testar la estrategia de selección positiva-negativa, las células NP18 fueron escogidas por presentar una sensibilidad parcial al tratamiento con docetaxel. Estas células fueron modificadas con un plásmido retroviral, que expresaba el gen de la MDR1, y el plásmido episomal pEPI_DHFR/TK, que expresaba el gen de la TK. La selección *in vitro* mediante docetaxel y MTX permitió seleccionar la población que expresaba ambos genes. La generación de un gen de fusión MDR/TK hubiera otorgado más seguridad que el uso de dos vectores por separado. Aún así, dicho gen de fusión no sería eficaz, ya que la pGP y la proteína TK realizan su función en lugares distintos de la célula. En relación a la seguridad de combinar el gen MDR1 y el gen de la TK, los estudios realizados por Sugimoto y colaboradores indicaron que no existía una resistencia cruzada entre estos dos genes.¹⁶⁶

La caracterización de las NP18 modificadas mostró una sobreexpresión de la Pgp tanto en las células modificadas con el gen MDR1 como en las células modificadas con los dos genes de selección. Este resultado confirmaba que el gen suicida TK no interfiere en la expresión del gen MDR1. Sin embargo, las células NP18 parentales también mostraron una expresión basal de la Pgp.¹¹⁸ Según la bibliografía, tejidos como el colon, el riñón o el páncreas presentan una alta expresión del gen MDR1. Esta expresión innata condiciona la generación de tumores quimioresistentes⁵ y estaría de acuerdo con la expresión basal de la pGP en las NP18 parentales. A pesar de la expresión basal de esta proteína en la línea parental NP18, consideramos que la transducción del gen MDR1 bajo un promotor constitutivo conferiría a las células modificadas un aumento en la resistencia a la droga de selección. Según lo esperado, las células NP18-MDR/TK mostraron una resistencia aumentada a docetaxel en comparación con las NP18 sin modificar.¹¹⁸ Esta resistencia a la droga de selección también fue confirmada *in vivo*.¹¹⁸ Por otro lado, este compuesto disminuyó el crecimiento de los tumores NP18 parentales. Este efecto fue más evidente que en el modelo tumoral de HCT116 tratado con MTX, lo que nos indicaba que la selección positiva sería más efectiva en el modelo de NP18. Aún así, en este modelo obtuvimos un incremento de la población modificada de seis a ocho veces después de la selección positiva¹¹⁸, similar a los obtenidos con el modelo de HCT116¹⁵.

Por otro lado, las células modificadas con los dos genes de selección mostraron sensibilidad a GCV *in vitro*.¹¹⁸ Además, los cultivos mixtos formados por células modificadas y células sin modificar presentaron un potente efecto colateral después de tratar GCV¹¹⁸, muy superior al observado en el modelo de HCT116. Esto es debido a la expresión de uniones intercelulares *gap* en la membrana de las células NP18. En nuestro modelo murino, la terapia suicida *per se* no mostró ningún efecto en tumores con un 4% de células modificadas, pero sí que presentó una respuesta antitumoral inicial en tumores con un 10%.¹¹⁸ A pesar de esta eficacia inicial, y de acuerdo con los resultados de Sandmair y colaboradores¹¹⁷, esta proporción de células suicidas

no fue suficiente para obtener una respuesta completa y los tumores recrecieron una vez finalizado el tratamiento con GCV.¹¹⁸ Las diferencias observadas entre los tumores con un 4% y con un 10% de células modificadas sugieren que pequeños cambios de la proporción de células modificadas con genes suicidas pueden ser muy relevantes para la eficacia de la terapia génica suicida.

Asimismo, el aumento de la proporción de células modificadas mediante la selección positiva mejoró la terapia génica suicida de los tumores con un 4% inicial. Esta mejora en la respuesta antitumoral confirma la eficacia de la selección positiva como mecanismo de amplificación del efecto suicida. Sin embargo, la baja proporción inicial no permitió alcanzar el número de células suficiente para eliminar los tumores. Fue necesario aumentar la proporción inicial de células modificadas hasta un 10% para obtener regresiones completas después de la selección positiva-negativa. Aún así, hay que remarcar que algunos de los tumores de este grupo no regresaron completamente. En estos casos, el volumen de estos tumores disminuyó y se estabilizó durante el resto del experimento. El tumor remanente estaba formado por fibrosis y células tumorales. Estas células tumorales se cultivaron *in vitro* y mostraron sensibilidad a GCV, lo que sugiere que la falta de regresión fue por la baja tasa proliferativa del tumor y no por la adquisición de resistencias, dado que el sistema TK/GCV es altamente dependiente de la proliferación celular. El uso de sistemas suicidas como la nitroreductasa/CB1954 o el citocromo P450 2B1/fosfamida, con un mecanismo de toxicidad mediado por las uniones cruzadas en el ADN e independiente de ciclo celular^{95, 100}, permitiría eliminar estas células tumorales quiescentes.

Los experimentos *in vitro* e *in vivo* realizados con las células NP18-MDR/TK no mostraron una selección positiva de dichas células en ausencia de droga de selección. Estos resultados concuerdan con los experimentos realizados en humanos con células hematopoyéticas transducidas con el gen MDR1.^{161, 262-265} Por el contrario, Bunting y colaboradores observaron que la sobreexpresión del gen MDR1 en ratones se asociaba al desarrollo de una mieloproliferación similar a la que se producía en la leucemia mieloide crónica.¹⁶² Años más tarde, Modlich y colaboradores mostraron que esta leucogénesis documentada en modelos murinos transplantados con precursores hematopoyéticos modificados con el gen MDR1 podía ser atribuida a la mutación insercional del vector retroviral transportador del gen MDR1 y no a la sobreexpresión de este gen.²⁶⁶ Aún así, son necesarios más estudios de seguridad para descartar este efecto indeseado asociado al gen MDR1.

En conclusión, las dos aproximaciones de selección positiva-negativa presentadas anteriormente demuestran que el enriquecimiento de las células modificadas con genes suicidas en el tumor puede aumentar los niveles de transducción de los vectores de transferencia utilizados en la clínica.¹¹⁸

4. Precedentes de la selección positiva-negativa

El único precedente que existe hasta el momento sobre selección positiva-negativa de células tumorales fue publicado por Unger y colaboradores durante el transcurso de la presente tesis.²⁶⁷ En él, se utilizó la función dual del gen de fusión FCU para seleccionar positiva y negativamente las células tumorales modificadas. El gen FCU, junto con el inhibidor de la aspartato carbamilo transferasa (PALA) y la citosina exógena, permitió enriquecer la población de células tumorales transducidas. Después del período de selección positiva, la prodroga 5-FC permitió seleccionar negativamente dichas células.²⁶⁷

Los resultados obtenidos por este grupo indicaron que el tratamiento con PALA en presencia de citosina aumentaba de dos a tres veces la proporción inicial de células modificadas en cultivos mixtos. Estos resultados mostraban que el enriquecimiento conseguido con su estrategia era inferior al obtenido por nosotros con el sistema DHFR/TK.¹⁵ La selección positiva de tumores subcutáneos con un 6% de células tumorales modificadas iniciales les permitió aumentar la proporción de esta población dentro del tumor. Este enriquecimiento de las células modificadas con genes suicidas y la posterior administración sistémica del 5-FC permitió la disminución significativa del crecimiento tumoral en un modelo de neuroblastoma.²⁶⁷ Al igual que los resultados obtenidos con el sistema DHFR/TK¹⁵ o MDR/TK¹¹⁸, esta respuesta antitumoral fue superior a la obtenida mediante la aplicación de la terapia suicida *per se*. A pesar de estos resultados esperanzadores, ellos no obtuvieron regresiones completas y los tumores recrecieron pocos días después de finalizar el tratamiento con 5-FC.²⁶⁷

La principal diferencia entre la estrategia de Unger y colaboradores y la propuesta en esta tesis es el gen de selección utilizado. El uso del gen dual FCU como marcador de selección positivo y negativo limita la aplicación de esta estrategia a tumores que sean sensibles a la droga de selección (PALA) y al sistema suicida FCU. En cambio, en nuestra aproximación, el uso de dos genes diferentes permite elegir el marcador de selección positiva y negativa más adecuado para cada tipo de tumor. Además, la selección positiva con el gen FCU requiere altas concentraciones de PALA y de citosina en el tumor. Esto dificulta la eficiencia de dicha selección, limita su aplicación clínica y sugiere el uso de otros marcadores de selección positiva como los genes de resistencia a drogas, utilizados en esta tesis. Éstos solamente requieren la administración de una droga, generalmente bien estudiada en la clínica, para ejercer la selección positiva de las células modificadas.

5. Vectores de transferencia génica estable sugeridos para el transporte de los genes de selección

Como hemos demostrado, el uso de los genes de resistencia a drogas permite enriquecer la proporción de células modificadas con genes suicidas y mejorar la eficacia terapéutica del sistema TK/GCV. Aún así, toda terapia génica suicida consta de dos fases: el transporte de los genes suicidas hacia el tumor mediante vectores de transferencia y la aplicación de la terapia suicida *per se*. En esta tesis, la modificación de las células tumorales se realizó *ex vivo* y se trabajó con tumores mixtos formados por una mezcla de células transducidas y no transducidas. Esta aproximación permitió evaluar la prueba de concepto de la estrategia de selección positiva-negativa, sin depender de la eficacia de los vectores de transferencia. Al igual que en presente trabajo, este sistema artificial de tumores mixtos también fue utilizado por Unger y colaboradores en su estrategia de selección positiva-negativa con el gen dual FCU.²⁶⁷ En el siguiente apartado, sugerimos varios sistemas de transferencia génica que podrían ser utilizados para dirigir los genes de selección hacia las células diana.

5. 1. Vectores destinados a una administración intratumoral

Como hemos dicho anteriormente, la estrategia de selección positiva-negativa se basa en la expresión estable de los genes de selección, ya sea DHFR/TK o MDR1/TK, en las células tumorales. Los vectores retrovirales se integran y permiten expresar de forma estable el transgen, pero tienen el riesgo de generar mutaciones insercionales³⁰ y, por este motivo, están limitados a una administración intratumoral. El uso de los vectores lentivirales disminuye el riesgo mutacional y mejora la eficiencia de transducción pero, aún así, su poca especificidad tumoral dificulta su administración sistémica en la práctica clínica. Con una finalidad diferente a la presentada en esta tesis, Mayer-Kuckuk y colaboradores diseñaron un vector retroviral que expresaba el gen de fusión DHFR/TK. El objetivo principal de este grupo era demostrar que podían modular la expresión de un gen reportero (TK) fusionado a un gen de resistencia a drogas (DHFR) mediante el tratamiento con una droga de selección (TMTX). Los resultados de este estudio demostraron que el tratamiento con TMTX incrementaba los niveles de expresión del gen de fusión de dos a cuatro veces en un modelo murino con tumores colorectales HCT-8.¹⁶⁷ Por otro lado, Sugimoto y colaboradores diseñaron otro vector retroviral que expresaba el gen MDR y el gen de la TK unido mediante una secuencia IRES (pHa-MDR-IRES-TK).¹⁶⁶ En este caso, la finalidad de este vector era proteger la médula ósea de los efectos tóxicos de la quimioterapia con la seguridad de poder eliminar las células tumorales que por error habían sido transducidas con este vector.¹⁶⁶ Al margen del riesgo relacionado con el uso de vectores retrovirales, estas dos construcciones permitirían estudiar la eficacia de la selección positiva-

negativa después de la administración intratumoral del vector de transferencia, sin necesidad de generar tumores mixtos.

El plásmido episomal pEPI_DHFR/TK podría ser un buen candidato para dirigir el gen de fusión DHFR/TK a las células tumorales, permitir su expresión estable y evitar la mutación insercional de los vectores virales integrativos. El pEPI se ha utilizado para la transferencia génica estable de progenitores hematopoyéticos²⁶⁸ o líneas celulares como las K562^{268, 269}, las HepG2²⁷⁰ o las CHO^{47, 271}. Los estudios realizados por Manzini y colaboradores fueron de gran importancia para la futura aplicación de este vector no viral en la clínica.⁴⁹ En este trabajo se demostró que dicho vector podía modificar las células del esperma de un cerdo *ex vivo* y, después de ser introducidas en un oocito fértil, generar fetos de cerdo modificados con un gen reportero. Los resultados de este trabajo mostraron la expresión de la proteína reportera GFP en el 50% de los fetos obtenidos. En los animales positivos, todos los tejidos analizados mostraron expresión de la GFP y esta expresión se observó en el 79% del tejido.⁴⁹ A pesar de estos resultados esperanzadores, este plásmido episomal todavía no se ha utilizado para el tratamiento de tumores *in vivo*. Una primera aproximación podría ser la electroporación *in vivo*. Para su administración sistémica sería imprescindible realizar un estudio previo de biodistribución en modelos murinos con tumores subcutáneos y evaluar la selectividad y la eficacia de este vector para transducir las células tumorales *in vivo*.

Otro mecanismo para transportar los genes de selección sería el uso liposomas catiónicos. Éstos ya han sido utilizados para transportar genes suicidas (TK o CD) a las células tumorales después de una administración intratumoral.³⁶ El posterior tratamiento con la prodroga adecuada (GCV ó 5-FC) ha mostrado la regresión de los tumores en un modelo murino inmunocompetente.³⁶ A pesar de ello, la eficacia de transferencia génica de estos vectores no virales tiende a ser muy baja y dificulta su aplicación clínica.

5. 2. Vectores destinados a una administración sistémica

Los vectores AAV podrían ser utilizados para administrar sistémicamente los genes de selección. Estos vectores han demostrado la capacidad de transducir las células tumorales de forma estable después de su administración sistémica²⁷²⁻²⁷⁴, sin activar la respuesta inmune y sin el peligro de mutación insercional.³³ Los estudios de Streck y colaboradores demuestran que una dosis única de un vector AAV portador del gen antitumoral INF- β permite la transducción de las células tumorales y la regresión tumoral en un modelo de neuroblastoma ortotópico y diseminado.²⁷³ Resultados similares se han obtenido mediante la administración sistémica de un vector AAV portador del gen de fusión MDA-7/IL24.²⁷²

En general, estos vectores presentan una estrategia eficaz para transportar genes terapéuticos, como el INF- β o las IL, hacia los tumores después de una administración sistémica. Aún así, hasta el momento, todavía no se ha publicado el uso de estos vectores para transportar genes suicidas de forma sistémica.²⁷⁵⁻²⁷⁷ Otro factor limitante de estos vectores para su utilización como transportadores de genes de selección es el tamaño de la carga génica, que no puede exceder de las 4,7Kb. Esto impediría el transporte de genes de gran tamaño como el gen MDR1. Dicho gen, en combinación con el gen TK, superaría las 5Kb. Al igual que el gen MDR1, los genes de resistencia que codifican para proteínas con múltiples dominios transmembrana, como los genes de la familia MRP (MRP1-MRP8), tienen un tamaño superior a las 4Kb y, junto con un gen suicida, excederían el tamaño máximo de transporte de los vectores AAV. Aún así, genes como el ya mencionado DHFR, con un tamaño de 564pb, o el MGMT, con 717pb, en combinación con un gen suicida, sí que podrían ser transportados por los vectores AAV.

Por otro lado, existen diversos sistemas no virales que también podrían ser buenos candidatos para dirigir sistémicamente los genes de selección hacia las células tumorales. Los transposones son elementos genéticos móviles que se integran en los cromosomas. Uno de los elementos más estudiados es el transposón *Sleeping Beauty* (SB) que ha mostrado gran eficacia para insertar genes suicidas en diferentes líneas celulares tumorales de hepatocarcinoma.⁵⁵ La administración directa de transposones combinados con polietilenimina (PEI) ha permitido transportar agentes antiangiogénicos a tumores cerebrales y aumentar la supervivencia de los animales.⁵³ Liu y colaboradores demostraron que este vector no viral acompañado con PEI podía dirigir el gen de la sintasa del óxido nítrico hasta las células endoteliales pulmonares después de su administración sistémica, permitiendo la inhibición de la hipertensión pulmonar inducida en ratas.²⁷⁸ De forma similar, la inyección intravenosa de un transposón SB que expresaba el factor de coagulación VIII resultó en la corrección fenotípica de la hemofilia A en un modelo murino.²⁷⁹

La principal limitación del uso de estos vectores en la terapia contra el cáncer es su bajo tropismo por las células tumorales. Todavía no se ha publicado ningún trabajo que muestre la proporción de células tumorales que este vector es capaz de modificar después de su administración sistémica. Otro aspecto a tener en cuenta de estos vectores es el lugar de integración de la carga génica en el genoma de la célula. En estos últimos años diversos autores han discutido la posibilidad que exista regiones específicas de integración de estos vectores no virales.^{280, 281} Sería necesario realizar estudios más concluyentes sobre el riesgo de genotoxicidad de estos vectores. Sin embargo, hasta el momento, no existen evidencias que indiquen riesgo de mutagénesis insercional.⁵² Por este motivo, el uso del transposón SB es una estrategia eficaz y más segura que los vectores virales integrativos. Aún así, el empleo de sistemas de recombinación alternativos como la recombinasa ϕ C31, que aseguran la integración específica, aportarían una mayor seguridad.^{282, 283}

Por otro lado, la eficacia de transposición disminuye con el aumento del tamaño del inserto⁵⁴. Sin embargo, el transposón SB es capaz de transportar insertos de más de 10Kb, lo que permitiría transportar todo tipo de genes de selección.

Los vectores adenovirales han sido ampliamente utilizados para dirigir agentes terapéuticos hacia las células diana.²⁸⁴ Aún así, una de sus mayores limitaciones es la expresión transitoria de los transgenes. Yant y colaboradores incorporaron la maquinaria de integración del transposón SB en un vector adenoviral delecionado.²⁸⁵ Este sistema combinaba la eficacia del transporte sistémico de los vectores adenovirales y la integración de los transgenes mediada por los transposones. La administración sistémica de un adenotransposón modificado con el factor de coagulación humano IX (hFIX) permitió la integración estable de este gen terapéutico en los hepatocitos del ratón. Esta integración es suficiente para mantener niveles de hFIX durante más de 6 meses en un modelo murino a pesar de activar la proliferación del hígado.²⁸⁵ Una de las principales limitaciones de este sistema es la necesidad de administrar dos vectores adenovirales, uno para transportar el transposón y otro para transportar la transposasa. Esto disminuye la eficiencia de la técnica, ya que se necesita la transducción de ambos vectores en una misma célula para que se produzca la integración del gen terapéutico en el genoma.

El uso de nanopartículas catiónicas unidas a ligandos específicos de tumor como las integrinas $\alpha v \beta 3$ podría ser otra estrategia para transportar de forma sistémica los genes de selección. Hood y colaboradores utilizaron este sistema no viral para dirigir de forma sistémica genes terapéuticos al tejido tumoral en modelos murinos.^{44, 45} Este transporte selectivo permitió la eliminación de los tumores subcutáneos M21-L y las metástasis pulmonares y hepáticas inducidas por la administración sistémica de la línea tumoral colorrectal CT-26.⁴⁴ Al margen de estos resultados tan prometedores, sería necesario evaluar la eficacia de estos vectores cargados con otros genes antitumorales.

Como mecanismo alternativo a los vectores de transferencia génica, las células madre mesenquimales (MSC) han demostrado su capacidad para dirigir eficientemente genes terapéuticos hacia los tumores. En el **apartado 7** y **8** de esta discusión hablaremos más detenidamente del uso de este tipo celular en la estrategia de selección positiva-negativa y en la terapia contra el cáncer en general.

6. Consideraciones a tener en cuenta para diseñar y utilizar la estrategia de selección positiva-negativa

Existen muchos factores que determinan la eficacia terapéutica de la estrategia de selección positiva-negativa. Entre ellos encontramos los siguientes:

6.1. Elección del gen de selección positiva

Se conocen un gran número de genes resistencia a drogas y cada gen confiere resistencia a uno o varios compuestos. La utilización de genes que inducen resistencia a una única droga, como el DHFR o la Timidilato Sintasa (TS), confiere más seguridad que el uso de genes de resistencia a multidroga. Por este motivo, con la finalidad de restringir el perfil de resistencia del gen MDR1, se han generado algunos mutantes de dicho gen. Por ejemplo, el gen MDR1 humano salvaje (con una glicina en la posición 185) confiere una resistencia preferencial a vinblastina, mientras que el mutante con una valina en la posición 185 aumenta la resistencia a colchicina.²⁸⁶ Estas mutaciones permiten adaptar el perfil de resistencias al tumor a tratar. Aún así, los genes de resistencia a varias drogas permiten escoger la droga más adecuada para cada tipo de tumor sin necesidad de cambiar de gen, incluso, ofrecen la posibilidad de usar cócteles de compuestos. Por otro lado, la combinación de dos genes de resistencia simultáneos también permitiría el uso de varias drogas de selección y un enriquecimiento mayor de las células modificadas.²⁸⁷

La estrategia de selección positiva-negativa se ha de utilizar en tumores que sean parcialmente sensibles a la droga de selección que se va a utilizar o que adquieran resistencia al tratamiento al cabo del tiempo. No se espera beneficio terapéutico en tumores que ya sean completamente resistentes a dicha droga. En el caso de resistencias debido a una sobreexpresión endógena del gen MDR1 se podría utilizar otros genes de selección como la MRP, la DHFR o la MGMT, que inducirían resistencia a otros tipos de drogas. Se ha demostrado que a diferencia del MDR1, la MRP2 y la MRP3 inducen resistencia al MTX y al cisplatino.²⁸⁸ Estos compuestos podrían ser utilizados para seleccionar positivamente las células modificadas con la MRP2 o la MRP3 y un gen suicida en tumores con una sobreexpresión del gen MDR1.

Muchos grupos han estudiado la expresión de los genes de resistencia a drogas en los tumores. Esta información podría ser de enorme utilidad para escoger los pacientes con tumores que tenga una baja expresión del gen de selección que se va a utilizar.

Como mecanismo de seguridad, la estrategia de selección positiva-negativa se utilizará una vez la primera línea de tratamiento haya fallado. Para ello, los genes de resistencia que se utilicen como marcadores de selección no tendrán que otorgar resistencia a compuestos que se

utilicen en el tratamiento estándar del tumor diana. Por ejemplo, el tratamiento del cáncer de colon se basa en el 5-FU y leucovorina, combinados con oxaliplatino e irinotecan. La utilización del gen de selección MDR1 induciría resistencia al tratamiento con irinotecan. En cambio, el uso del gen DHFR o del gen MGMT sería una opción más segura ya que conferirían resistencia al MTX o al TMZ respectivamente, sin interferir en el tratamiento convencional. Por otro lado, la primera línea de tratamiento del glioblastoma se basa en la quimioterapia de la TMZ y del BCNU. En este caso, no sería indicado el uso del gen de resistencia MGMT, pero sí que podrían ser buenos candidatos los genes DHFR, MDR o MRP.

6. 2. Elección del gen de selección negativa

Para escoger el gen suicida se ha de tener en cuenta el tipo de tumor a tratar. La expresión de uniones intercelulares *gap* en las células diana determina la eficacia del efecto colateral del sistema TK/GCV⁷¹. Según los resultados de Burrows y colaboradores los gliomas y los melanomas tienen una expresión de uniones *gap* superior a los tumores colorectales y la terapia génica suicida con el gen de la TK tendría que ser más efectiva.⁷¹ Otros autores discrepan con estos resultados y muestran que los gliomas expresan niveles muy bajos de uniones *gap*.²⁸⁹ Aún así, estas uniones son funcionales y permiten la generación del efecto colateral mediado por el sistema TK/GCV.²⁸⁹ El uso de sistemas suicidas, como el FCU/5-FC, el NTR/CB1954 o el CYP2B1/IFO, con un efecto colateral independiente de las uniones intercelulares *gap*, serían una mejor opción para el tratamiento de tumores que no expresan este tipo de uniones.^{97, 103, 136}

Otro punto a tener en cuenta en la elección del gen suicida es la posibilidad de estudiar la expresión del transgén *in vivo* mediante métodos de imagen no invasivos. El gen de la TK es uno de los genes reporteros más utilizados en los estudios de imagen.²⁹⁰ Fontanellas y colaboradores monitorizaron la biodistribución de un vector adenoviral portador del gen de la TK en un modelo de macaco mediante la tomografía de emisión de positrones (PET). Este experimento mostró que la expresión del transgén y, por lo tanto, del vector viral se localizaba mayoritariamente en el hígado.²⁹¹ Por el contrario, Gade y colaboradores monitorizaron la concentración y la actividad del gen FCU presente en las células tumorales implantadas en un ratón atímico mediante resonancia magnética (MR).²⁹²

Para asegurar una buena selección negativa se requiere la expresión estable de los genes suicidas durante todo el período de selección positiva, sin que se produzcan mutaciones, deleciones²⁹³ ni silenciamientos²⁹⁴ del gen. Aparte de la disminución de la expresión del gen suicida, existen diversos factores que pueden estar implicados en mecanismos de resistencia a esta terapia. Entre estos, encontramos la expresión del gen antiapoptótico BCL2²⁹⁵, la

sobreexpresión del transportador de nucleótidos MRP4, que aumenta la expulsión de los metabolitos tóxicos de la célula²⁹⁶, o la expresión de las formas mutadas de p21²⁹⁷ y p53²⁹⁸. Sería interesante estudiar la expresión de estos genes en las células tumorales para escoger el gen suicida más apropiado según las características genotípicas del tumor.

6.3. Combinación del marcador de selección positiva y el gen suicida

La fusión del gen de selección positiva y del gen suicida garantiza la transducción de ambos genes en las células tumorales. Esto evitaría el efecto indeseado de transducir células tumorales únicamente con el gen de resistencia a drogas. La principal limitación de esta aproximación es que se requiere que ambos genes realicen su función en el mismo compartimento celular.

La utilización de genes bifuncionales como la CD, el MDR1 o el FCU aporta una seguridad adicional.^{267, 299} Dependiendo del sustrato, estos genes pueden funcionar como genes de selección positiva o negativa. En concreto, los genes CD y FCU, en combinación con la droga de selección PALA y con la citosina, pueden ser utilizados para enriquecer una población celular.³⁰⁰ ²⁶⁷ En cambio, la administración de la prodroga 5-FC permite eliminar las células modificadas.²⁶⁷ Por otro lado, el gen MDR1 puede ser usado como marcador de selección positiva en presencia de taxanos, alcaloides de la vinca, antraciclinas o epipodofilotoxinas. En cambio, la combinación con un compuesto denominada Verotoxina (VT)³⁰¹ permite la selección negativa selectiva de dichas células.³⁰²

A pesar de la seguridad que confieren estos genes duales, la aplicación de esta estrategia de selección positiva-negativa *in vivo* es muy compleja. En el caso de la CD y del FCU, se requiere la presencia de varios compuestos (PALA y citosina) en el tumor durante largos períodos de tiempo para generar una selección positiva eficiente. Por otro lado, el uso del gen MDR1 como marcador de selección negativa está limitado por la toxicidad sistémica de la VT. Esta toxicidad restringe el uso de esta droga a una aplicación local³⁰³, lo que impide el tratamiento de los tumores diseminados. Sería necesario realizar estudios más exhaustivos sobre el mecanismo de acción de esta toxina para evaluar su perfil de toxicidad *in vivo*.

La unión de ambos genes mediante una secuencia IRES evita las limitaciones de los genes de fusión y de los genes bifuncionales, pero sigue asegurando la transducción de los dos genes de selección en la misma célula tumoral. Una vez los genes se han internalizado dentro de la célula, la secuencia IRES permite la transducción independiente de las dos proteínas a partir de un ARN mensajero común. A pesar de la expresión a partir de un mensajero común, hay autores que concluyen que la expresión del segundo gen, dependiente de la secuencia IRES, es inferior a la expresión del primer gen, dirigida por un promotor.^{304, 305} En las últimas décadas se han

generado un gran número de vectores retrovirales bicistrónicos que expresan el gen de selección MDR1 unido a genes terapéuticos mediante una secuencia IRES.^{166, 224, 225, 306, 307} Sugimoto y colaboradores diseñaron un vector bicistrónico que expresaba el gen MDR1 y el gen gp91, la deficiencia del cual es la responsable de la enfermedad granulomatosa crónica ligada al cromosoma X (X-CGD), para el tratamiento de esta enfermedad en un modelo murino. Este estudio demostró la posibilidad de enriquecer las células modificadas *in vitro* con vincristina e *in vivo* mediante el tratamiento con paclitaxel.²²⁵

6.4. Aplicación de la estrategia de selección positiva-negativa

La población de células que se quiere enriquecer tendría que ser transducida con el gen de selección y el gen suicida justo antes de tratar los tumores con la droga de selección. Así, el tratamiento podría inducir una presión selectiva y generar un enriquecimiento de las células tumorales modificadas. En caso contrario, la presencia de la droga de selección antes de la transducción induciría la generación de resistencias e impediría esta selección positiva.

El espacio de tiempo entre la administración de la droga de selección y la adquisición de resistencia (período de selección positiva) ha de ser el suficiente para que las células modificadas se expandan y repoblen el tumor.

La selección positiva se tendría que aplicar antes de la selección negativa. La aplicación de la terapia génica suicida antes de enriquecer la población de células modificadas disminuiría la eficacia antitumoral.

7. Justificación del uso de MSC como transportadores de genes terapéuticos hacia el tumor

La aplicación intratumoral de vectores virales que expresan genes suicidas ha sido documentada en numerosos artículos (ver INTRODUCCIÓN, **Tabla 8** ensayos clínicos con genes suicidas). Para dirigir sistémicamente los vectores virales hacia los tumores sin inducir toxicidad en los tejidos sanos, se han utilizado diversas estrategias entre las que encontramos la incorporación de promotores específicos del tejido diana¹³⁴ o la modificación de la superficie viral con anticuerpos o motivos peptídicos que reconocen proteínas de superficie sobreexpresadas en tumores²⁸⁴. Aún así, la activación de la respuesta inmune y las barreras físicas limitan la llegada de los vectores virales a las lesiones tumorales.³⁰⁸

Los vehículos celulares han sido utilizados desde hace décadas como otra estrategia para transportar agentes terapéuticos hacia los tumores de forma sistémica. Una de las ventajas que

ofrecen estos transportadores es que, a diferencia de algunos vectores virales, no activan el sistema inmune. Diversos tipos celulares han sido testados entre los que encontramos las células empaquetadoras de vectores retrovirales^{249, 309}, las células endoteliales, los linfocitos T³¹⁰⁻³¹², los monocitos, las células dendríticas^{313, 314} y los macrófagos³¹⁵. Todos ellos han mostrado, en mayor o menor medida, una limitada habilidad migratoria. Sin embargo, las propias células tumorales presentan un tropismo específico hacia las lesiones tumorales y han sido utilizadas para transportar genes suicidas³¹⁶, virus oncolíticos^{317, 318} o genes estimuladores de la respuesta inmune (GM-CSF)³¹⁹ hacia el tumor. Como mecanismo de seguridad, antes de su administración sistémica, estas células tumorales transportadoras son irradiadas. Aún así, la principal desventaja del uso de estas células como vehículos celulares es su propia tumorigenicidad que puede contribuir a la progresión de la enfermedad o incluso a la generación de nuevos tumores.

En los últimos años, las células madre han sido propuestas como vehículos celulares para el tratamiento de las enfermedades neoplásicas.²²⁰ Numerosos estudios demuestran el tropismo de estas células hacia los tumores¹³⁵ y su incorporación dentro del estroma tumoral^{220, 320}. Incluso, se ha documentado que estas células pueden dar lugar a la vasculatura tumoral o los fibroblastos asociados a tumor (TAF)^{149, 321, 322}. Este oncotropismo de las células madre permite dirigir agentes terapéuticos hacia la masa tumoral sin riesgo de generar tumores y sin depender de su origen ni del gen terapéutico que transportan.^{93, 323-327} Además, este transporte es más eficiente que el de los vectores no virales^{328, 329} o incluso superior al de los vectores virales modificados.²⁸⁴ Aún así, una dosis única sistémica de MSC modificadas con un gen terapéutico no permite la regresión total de los tumores.¹³⁶ En parte, esto es debido a una acumulación preferente de estas células en los pulmones, la primera barrera física después de una administración sistémica. Este secuestro inespecífico en el pulmón disminuye el número de células modificadas que alcanzan el tumor³³⁰, al igual que ocurre con el resto de vehículos celulares³³¹. Ciertos grupos han utilizado este acúmulo inespecífico en el pulmón para transportar genes suicidas a las metástasis de dicho órgano.³³² Una vez en el pulmón, el microambiente tumoral permite la supervivencia y la proliferación de las células madre, lo que contribuye a la acumulación de estas células en las metástasis pulmonares y la baja persistencia en el tejido sano.³³²

Con la finalidad de mejorar la terapia antitumoral, diversas estrategias han sido utilizadas para aumentar el número de MSC modificadas con genes terapéuticos en el tumor. Klopp y colaboradores demostraron que la irradiación de los tumores podía aumentar el tropismo de las MSC hacia él.²¹⁸ Esta radiación induce la expresión de mediadores inflamatorios en el tumor que aumentan el reclutamiento de las MSC administradas de forma sistémica.²¹⁸ Otra estrategia para aumentar la cantidad de MSC modificadas en el tumor ha sido la administración sistémica repetida de dichas células.⁹⁴

8. Uso de la estrategia de selección positiva-negativa con MSC

En esta tesis doctoral proponemos el uso de la selección positiva-negativa como mecanismo para aumentar las MSC modificadas con genes terapéuticos en el tumor. Para probar este concepto, aislamos MSC de grasa de ratón (mMSC). Actualmente, se han aislado MSC de una gran variedad de tejidos.¹⁷⁴ Aún así, por su fácil extracción¹⁹⁰ y su elevada capacidad migratoria hacia las regiones tumorales¹³⁶ decidimos utilizar las MSC de tejido adiposo. Una vez extraídas, determinamos la resistencia de dichas células a MTX y docetaxel. Ciertos autores han documentado la resistencia de las MSC a un amplio espectro de drogas con diferentes mecanismos de acción (cisplatino, ciclofosfamida, MTX y etoposido).³³³ Además, la presencia y el aislamiento de MSC completamente viables de pacientes tratados con diferentes cócteles de agentes quimioterapéuticos había demostrado su resistencia *in vivo*.³³⁴ En nuestros experimentos, las mMSC presentaron una alta resistencia a MTX en comparación con la línea tumoral HCT116 (datos no presentados en esta tesis) y una cierta resistencia a docetaxel comparado con la línea tumoral NP18 (**Figura 1**, ANEXO II: RESULTADOS). Esta resistencia innata de las mMSC concordaba con los resultados publicados con hMSC.³³³ Algunos grupos han postulado que este efecto protector de las MSC puede ser debido a una resistencia innata a la apoptosis³³⁴ o a una sobreexpresión de genes de resistencia a drogas.³³⁵

La selección positiva de las mMSC la realizamos frente a la línea tumoral pancreática humana NP18, que había mostrado previamente una sensibilidad inicial al tratamiento con docetaxel.¹¹⁸ El uso de un modelo pancreático presentaba una ventaja adicional; estos tumores reclutan una gran proporción de tejido fibrótico. Por este motivo, postulamos que las MSC precursoras de los fibroblastos asociados al tumor (TAF)¹⁴⁹, en presencia de docetaxel, podrían ser seleccionadas respecto a los TAF endógenos, enriqueciéndose en el tumor.

La resistencia innata de las mMSC permitió enriquecer esta población en un cocultivo con células NP18 después del tratamiento con docetaxel (**Figura 2**, ANEXO II: RESULTADOS). La determinación de esta selección positiva se realizó mediante el cálculo de la proporción de células mMSC antes y después del tratamiento. Al final del experimento, en los pozos controles se observó una disminución del porcentaje de rFL-MSC-MDR/FCU respecto a las proporciones iniciales. Esto podía ser debido a la alta tasa proliferativa de la línea tumoral NP18 *in vitro*, que impedía evaluar el crecimiento de las células modificadas, en ausencia de droga de selección (**Figura 2**, ANEXO II: RESULTADOS). A pesar de los resultados obtenidos *in vitro*, no pudimos aumentar la proporción de mMSC en tumores NP18 *in vivo* mediante el tratamiento con docetaxel (**Figura 3**, ANEXO II: RESULTADOS). Existen tres posibles explicaciones para estos resultados:

- La sensibilidad de las MSC a compuestos como el paclitaxel, la vincristina o el etopósido ha sido documentada por Li y colaboradores.³³³ Podría ser que la limitada resistencia innata a docetaxel no pudiese proteger a las mMSC de los efectos tóxicos de las altas dosis de docetaxel *in vivo*.
- Se ha visto que la resistencia innata de las MSC a quimioterapia disminuye con el número de divisiones (pases)¹³⁶ y en nuestro caso trabajamos con células que estaban entre pase 13 y 15. Es posible que el uso de mMSC a pases más tempranos pudiese mejorar esta selección positiva *in vivo*.
- Uno de los principales problemas del uso de las células madre adultas es su estado de quiescencia. En este caso, la resistencia innata de las mMSC permitiría el enriquecimiento de estas células a expensas de la muerte de las NP18, pero la baja tasa de proliferación de las mMSC celular dificultaría la repoblación *in vivo* y, por lo tanto, su enriquecimiento en el tumor.

Se ha demostrado que la tasa proliferativa y la viabilidad de las MSC puede variar dependiendo de la especie y de su origen. En concreto, se ha visto que las MSC humanas proliferan más que las de ratón y que la viabilidad de las MSC de tejido adiposo humano es superior a la de las MSC de médula ósea humana.¹⁸¹ Estudios realizados por Moreno y colaboradores indican que mientras las MSC de médula ósea tienen un crecimiento lineal, las de hígado fetal crecen de forma exponencial.¹⁹⁶ Además, estas MSC fetales pueden ser transducidas con gran eficiencia mediante vectores retrovirales o lentivirales y mantener la expresión del transgén durante largos períodos de tiempo.¹⁸² Por estos motivos decidimos utilizar las MSC de hígado fetal de conejo (rFL-MSC¹⁹⁶), caracterizadas por el doctor Moreno, como prueba de concepto de la estrategia de selección positiva-negativa con células madre.

Con la finalidad de mejorar la resistencia de estas células a una droga de selección optamos por modificarlas con un vector retroviral que expresaba el gen de resistencia a multidroga MDR1. Como alternativa a los vectores retrovirales, los vectores adenovirales podrían haber sido utilizados para transferir el gen de resistencia a las células diana. Dichos vectores no son integrativos y, por lo tanto, no permiten la expresión estable del transgén en la célula diana. Aún así, los vectores adenovirales se han utilizado en experimentos de biodistribución para modificar las MSC con genes reporteros. Estos experimentos han mostrado el mantenimiento de la expresión del transgén durante al menos dos semanas.¹³⁵ Por otro lado, se ha demostrado que en pocos días de tratamiento con la droga de selección se puede enriquecer una población de células transducidas.¹⁵⁹ En nuestro modelo tumoral, la selección positiva con docetaxel duró unas 3 semanas. Por este motivo, la transducción de las MSC con un vector adenoviral portador

de un gen de resistencia a drogas podría haber permitido la selección positiva de las células modificadas antes de que se perdiese la expresión del transgén. Esta pérdida del gen de resistencia, después de la selección positiva, hubiese aportado un mecanismo de seguridad adicional, evitando así la posible generación de células tumorales resistentes.

En la presente tesis, el gen suicida FCU fue utilizado para seleccionar negativamente las MSC modificadas. Dicho gen^{94, 332} ha mostrado un efecto antitumoral superior al inducido por el gen suicida TK.^{336, 337} Aún así, Matuskova y colaboradores han demostrado la formación de uniones *gap* entre las MSC y las células de glioblastoma.³³⁷ De acuerdo con estos resultados, Zischek y colaboradores han publicado recientemente la eficacia terapéutica de las MSC modificadas con el gen TK en un modelo de carcinoma pancreático metastático.²⁵⁰ Por lo tanto, la combinación del sistema suicida TK/GCV con las MSC continua siendo una estrategia a tener en cuenta. Otro gen suicida candidato para ser transportado por las MSC es la carboxilesterasa de conejo (rCE).³³⁸ Danks y colaboradores demostraron que la administración sistémica de células madre neurales inmortalizadas modificadas con el gen rCE aumentaba los niveles de SN-38 (metabolito tóxico del CPT-11) en el tumor una vez administrada la prodroga CPT-11.³³⁹ Esta estrategia permitió la eliminación de todos los tumores y la supervivencia del 90% de los ratones durante un año sin presentar recidivas detectables³³⁹, sin duda, uno de los resultados más prometedores hasta el momento en terapia génica suicida.

Para probar la estrategia de selección positiva-negativa en las rFL-MSC estas células fueron modificadas con dos retrovirus, uno que expresaba el gen de selección positiva MDR1 y otro que expresaba el gen de selección negativa FCU. De acuerdo con los experimentos publicados hasta el momento^{136, 220}, no se observó ninguna disminución en la capacidad de diferenciación de las rFL-MSC-MDR/FCU debido a la transducción retroviral o a la expresión del transgén (**Figura 4**, ANEXO II: RESULTADOS)

Tanto las células modificadas con el gen MDR como las células modificadas con los dos genes de selección mostraron una elevada resistencia a docetaxel en comparación con las NP18 y con las rFL-MSC parentales (**Figura 5A**, ANEXO II: RESULTADOS). Estos niveles de resistencia similares entre las dos poblaciones de células modificadas indicaban que el gen FCU no interfería en la función del gen MDR. Dicha resistencia permitió seleccionar la población de células modificadas en un cocultivo con células tumorales NP18 mediante el tratamiento con la droga de selección (**Figura 6**, ANEXO II: RESULTADOS). Por otro lado, la población modificada con los dos genes de selección presentó sensibilidad a GCV y un efecto colateral potente en cultivos mixtos con células NP18 (**Figura 5B**, ANEXO II: RESULTADOS), similar al ya documentado con otras células madre modificadas con el gen FCU.³³² Aún así, este efecto

colateral fue inferior al observado en cocultivos con células NP18 parentales y células NP18 modificadas con el gen TK¹¹⁸ o con el gen FCU (datos no presentados en esta tesis). Posiblemente, la alta tasa proliferativa de las células NP18 modificadas permite metabolizar la prodroga de una forma más eficiente que en el caso de las MSC modificadas, aumentando así el efecto tóxico.

Los tumores formados por una mezcla de células NP18 y rFL-MSC presentaron una aceleración en el crecimiento tumoral en comparación con los controles, al igual que los tumores que contenían mMSC (datos no presentados en esta tesis). La relación entre las células tumorales y las MSC es muy compleja y varía según el tipo de tumor. Por un lado, se ha documentado que las MSC pueden ayudar al crecimiento de los tumores subcutáneos y a la generación de metástasis cuando se coinyectan con células tumorales.^{322, 340} Este sobrecrecimiento tumoral inducido por las MSC es causado por dos factores principales. En primer lugar, la secreción de factores solubles que aumentan la supervivencia y la proliferación de las células tumorales³⁴¹, y en segundo lugar, la inmunosupresión causada por las MSC.³⁴² De forma global, esto permite la formación de un microambiente favorable para el crecimiento de las células tumorales. Los resultados obtenidos por Karnoub y colaboradores indican que el incremento del poder metastático, por parte de las MSC, depende de un contacto continuo entre el estroma y las células tumorales.³²² Esto hace necesario la presencia de MSC para la generación de las metástasis y, por lo tanto, el uso de MSC modificadas con genes suicidas permitiría su eliminación después de la administración de la prodroga. Por otro lado, ciertos autores han observado que las MSC pueden inhibir el crecimiento tumoral en modelos animales^{343, 344}. Incluso, se ha publicado que, por sí solas, presentan un efecto antitumoral en un modelo de sarcoma de Kaposi³⁴⁵ y en un modelo de hematoma³⁴⁶, lo que corrobora que el efecto de las MSC sobre las células tumorales varía enormemente dependiendo del tipo de tumor.

Como hemos comentado anteriormente, todos los experimentos *in vivo* de esta tesis se han realizado en un modelo de ratón atómico. Por este motivo, las propiedades inmunomoduladoras de las MSC no pueden estar jugando un papel importante en el sobrecrecimiento de los tumores mixtos con rFL-MSC o con mMSC. Por lo tanto, la producción de factores de crecimiento en el tumor es posiblemente la responsable de este efecto protumoral. Dicho efecto nos indica indirectamente la viabilidad de estas células madre en el ambiente tumoral, ya demostrada por el doctor Jerónimo Blanco con MSC de tejido adiposo en tumores de próstata PC3.³³⁶ A pesar de ello, observamos una pérdida de expresión de la GFP en los tumores, a lo largo del tiempo, incluso en ausencia de selección (**Figura 7**, ANEXO II: RESULTADOS). Consideramos que la alta tasa de crecimiento de los tumores NP18 en ausencia de selección podía estar condicionando estos resultados. Para frenar el crecimiento de las células tumorales y favorecer

la selección positiva de las rFL-MSC-MDR/FCU se empezó el tratamiento con la droga de selección el día después de la implantación de los tumores. Aún así, la expresión de la GFP de los tumores siguió disminuyendo con el tiempo (**Figura 8**, ANEXO II: RESULTADOS). Diversas razones pueden explicar estos resultados:

- Los resultados obtenidos por Yu y colaboradores muestran que, a pesar del efecto protumoral inicial de las hASCs, el microambiente desfavorable del tumor induce la muerte de estas células en pocos días.³⁴¹ En nuestro modelo, este ambiente hostil se ve incrementado al mezclar MSC de conejo, en tumores humanos y en un modelo murino. A pesar de la viabilidad inicial de estas rFL-MSC, este ambiente puede inducir la muerte de estas células.
- Hasta el momento, nadie ha estudiado la reacción de las células fetales dentro de un microambiente tumoral. Estas células podrían mantenerse indiferenciadas y seguir dividiéndose como ocurre *in vitro* o diferenciarse y detener su crecimiento, lo que impediría su selección positiva.
- Experimentos publicados por Lee y colaboradores demuestran que las hMSC administradas de forma subcutánea, intravenosa o intraperitoneal en un modelo murino mantienen la expresión de transgenes terapéuticos durante períodos de tiempo superiores a 3 meses.³⁴⁷ De acuerdo con estos resultados, Chan y colaboradores revelaron que las MSC fetales humanas transducidas con un gen reportero podían mantener la expresión del transgén *in vitro* durante 14 semanas.¹⁸² A pesar de estos resultados, estudios muy recientes del doctor Moreno, pendientes de publicación, indican que las rFL-MSC poseen la capacidad de silenciar genes exógenos con gran facilidad y en poco tiempo. Nuestros estudios *in vitro* con las rFL-MSC-MDR/FCU-GFP no han mostrado una disminución de la expresión de ninguno de los transgenes. A pesar de ello, no podemos asegurar que este silenciamiento génico no pueda darse *in vivo*.

Un punto a tener en cuenta cuando se trabaja con células madre es su gran variabilidad, dependiendo del origen y especie. Incluso partiendo del mismo origen y de la misma especie, encontramos células madre con características similares, pero no idénticas, dependiendo del proceso de extracción y del laboratorio donde se hayan generado.³⁴⁸ Además, estas células presentan una tasa de crecimiento variable y acostumban a tener un bajo número de pasajes *in vitro*. Esta limitación dificulta la amplificación a gran escala, necesaria para su aplicación en la clínica. La generación de células madre inmortalizadas permite la expansión ilimitada de estas células y la reproducibilidad de los resultados entre un laboratorio y otro.^{349, 350} Existen

numerosos genes utilizados para immortalizar células madre entre los que encontramos el antígeno T del virus del simio 40³⁵¹, los oncogenes E6 y E7 del virus del papiloma humano³⁵⁰, la subunidad catalítica de la telomerasa humana (hTERT) sola^{352, 353} o combinada con el proto oncogén Bmi-1³⁵⁴, o el gen *v-myc*^{179, 349 355 356}. Las células madre immortalizadas con este último gen adquieren un aumento en su tasa proliferativa, conservan sus propiedades inmunomoduladores³⁵⁷ y su capacidad de diferenciación. A pesar de este efecto en la proliferación, las células immortalizadas con el gen *v-myc* no generan tumores en ratones SCID, después de su administración intravenosa o intracraneal³²³, ni adquieren inestabilidad genética, como ocurre en las células immortalizadas con otros genes³⁵⁸. La línea C17.2³⁴⁹, derivada de células progenitoras del cerebelo de ratón, y la línea HB1.F3¹⁷⁹, derivada de la cresta neural de feto humano, han sido ampliamente utilizadas para el tratamiento de gliomas³⁵⁷ y de neuroblastomas diseminados³³⁹. Estas células madre neurales immortalizadas no sólo han demostrado tropismo hacia tumores del mismo tipo celular, sino que también han sido capaces de migrar hacia melanomas subcutáneos implantados en ratones atímicos después de la administración sistémicamente.³⁵⁹

El uso de MSC immortalizadas con una tasa proliferativa superior y una expansión ilimitada podría aumentar la viabilidad de estas células en el tumor, mejorando así la selección positiva de las MSC modificadas con genes suicidas.

9. Uso de MSC productoras de retrovirus como factoría de genes de selección en el tumor

En el 2006 Silva y colaboradores propusieron la utilización de las MSC como células productoras de retrovirus, permitiendo así la transducción de las células diana *in situ*³⁶⁰, pero fue el grupo del doctor Ozawa el que lo llevó a la práctica, pocos años después. Durante la escritura de esta tesis, Uchibori y colaboradores describieron, por primera vez, la generación de MSC productoras de retrovirus (VP-MSCs). Los experimentos realizados por este grupo mostraban la capacidad de estas células modificadas para dirigirse al tumor y producir una progenie viral que infectase las células tumorales *in situ* (**Figura 1**).³⁶¹ La utilización de las MSC como factorías de virus oncolíticos ha sido recientemente publicada.^{223, 362} Yong y colaboradores demostraron que las MSC infectadas con un adenovirus oncolítico eran capaces de amplificar la carga viral inicial y dirigirla hacia las células tumorales sin activar el sistema inmune.²²³

Los estudios de biodistribución con las MSC productoras de un retrovirus reportero mostraron cierta señal inicial en órganos como el cerebro, el hígado, el riñón o el bazo, que fue disminuyendo a lo largo del tiempo. El tejido tumoral fue el único lugar donde se detectó una amplificación de la señal a lo largo del tiempo, lo que indicaba la sucesiva infección de las células tumorales mediante la progenie viral producida por las MSC modificadas. La administración

sistémica de MSC productoras de retrovirus TK mejoraba la eficacia de la terapia génica suicida en comparación con las MSC no productoras.³⁶¹ Aún así, no obtuvieron regresiones completas.

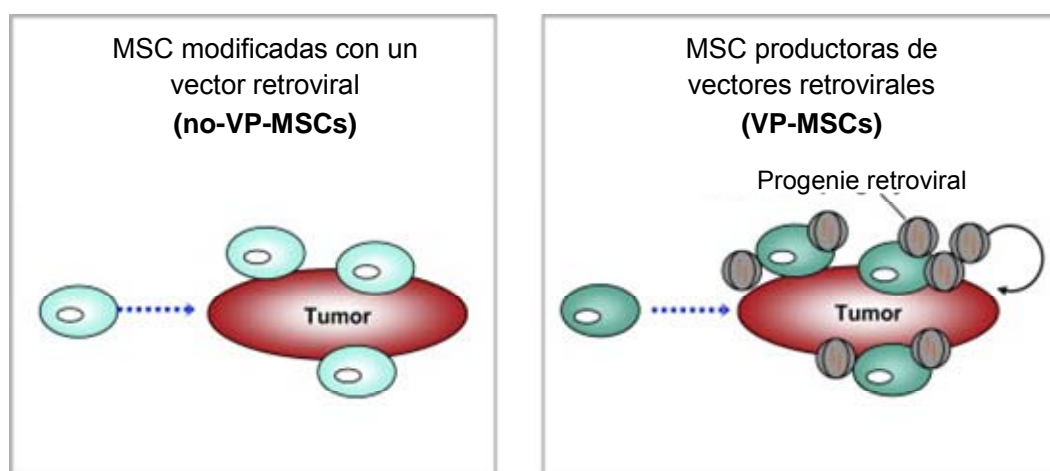


Figura 1. Utilización de MSC productoras de vectores retrovirales (VP-MSC) como estrategia terapéutica. Las MSC modificadas con retrovirus que expresan agentes antitumorales (no-VP-MSC) han sido ampliamente utilizadas para dirigir específicamente sustancias tóxicas hacia los tumores. Por otro lado, el uso de MSC productoras de retrovirus permite generar una progenie viral en el tejido tumoral, aumentando así, el efecto antitumoral. Adaptado de Ozawa et al. J. Autoimmunología 2008.

Este trabajo abre la posibilidad de generar MSC productoras de retrovirus MDR/TK³⁶³. Esto permitiría el transporte de genes de interés hacia los tumores mediante la administración sistémica de MSC productoras de retrovirus. Una vez allí, se produciría la amplificación *in situ* de la progenie viral, la infección y la expresión estable del transgén en las células tumorales. La selección positiva de las células tumorales modificadas mediante el tratamiento con docetaxel permitiría enriquecer la población portadora del gen suicida. Finalmente, la aplicación de la terapia génica suicida y el efecto colateral asociado eliminaría completamente el tumor. En el trabajo realizado por Uchibori y colaboradores, las MSC utilizadas producen retrovirus de forma transitoria con un pico de producción a los 48h que disminuye rápidamente con el tiempo.³⁶¹ La generación de MSC productoras de retrovirus estables permitiría mantener la producción de retrovirus *in situ* durante largos períodos de tiempo. El uso de células inmortalizadas^{179, 349} facilitaría la generación de estas células productoras estables. Además, evitaría la necesidad de intervenir al paciente y permitiría la reproducibilidad de los resultados en la preclínica y la producción de los vehículos celulares a gran escala y en poco tiempo para su posible aplicación clínica.

Con respecto a la seguridad de esta estrategia, el gen *v-myc* inmortaliza las células pero no las transforma en células tumorales.³⁶⁴ Aún así, el uso de células alogénicas permitiría el rechazo de éstas, pocos días después de su administración, una vez hubiesen transportado y amplificado la progenie viral en los tumores. Por otro lado, se ha documentado la llegada inespecífica de

MSC modificadas a órganos como el pulmón, hígado, riñón o bazo. Aún así, la progenie viral no es capaz de infectar estas células sanas³⁶¹ y si lo fuese, serían eliminadas durante la aplicación de la terapia génica suicida.

En conclusión, esta tesis doctoral propone una nueva estrategia para enriquecer las células modificadas con genes suicidas en el tumor y mejorar la eficacia de la terapia génica suicida. Las MSC productoras de retrovirus podrían ser utilizadas para dirigir los genes de selección hacia el tumor.

CONCLUSIONES

- 1.** El tratamiento con una droga de selección permite la selección positiva de las células modificadas con un gen de resistencia a drogas y con un gen suicida, y este enriquecimiento aumenta la eficacia de la terapia génica suicida.

- 2.** El metotrexato permite enriquecer *in vitro* e *in vivo* una población de células tumorales de cáncer de colon HCT116 que expresa simultáneamente el gen de resistencia a drogas dihidrofolato reductasa y el gen suicida timidina quinasa.

- 3.** El docetaxel permite enriquecer *in vivo* una población de células tumorales de adenocarcinoma pancreático NP18 que expresa simultáneamente el gen de resistencia a multidroga MDR1 y el gen suicida timidina quinasa.

- 4.** La administración de la prodroga ganciclovir después de un período de selección positiva de células tumorales modificadas con el gen suicida TK aumenta el efecto antitumoral de la terapia génica suicida.

- 5.** Tanto las células madre mesenquimales murinas como las células madre mesenquimales de hígado fetal de conejo pueden enriquecerse en cocultivos con células tumorales NP18 mediante el tratamiento con docetaxel. Este enriquecimiento se observa *in vitro*, pero no *in vivo*.

- 6.** En presencia de 5-FC, las rFL-MSD-MDR/TK inducen la muerte de las células tumorales NP18 mediante el efecto colateral.

BIBLIOGRAFÍA

1. Beck WT. Mechanisms of multidrug resistance in human tumor cells. The roles of P-glycoprotein, DNA topoisomerase II, and other factors. *Cancer Treat Rev.* Dec 1990;17 Suppl A:11-20.
2. Goldie JH, Coldman AJ. A mathematic model for relating the drug sensitivity of tumors to their spontaneous mutation rate. *Cancer Treat Rep.* Nov-Dec 1979;63(11-12):1727-1733.
3. Gottesman MM, Fojo T, Bates SE. Multidrug resistance in cancer: role of ATP-dependent transporters. *Nat Rev Cancer.* Jan 2002;2(1):48-58.
4. Thomas H, Coley HM. Overcoming multidrug resistance in cancer: an update on the clinical strategy of inhibiting p-glycoprotein. *Cancer Control.* Mar-Apr 2003;10(2):159-165.
5. Fernández F, Crombet O, Villares I, Pons R. Resistencia a drogas mediada por la glicoproteína P. *Rev Cubana Oncol.* 1998;14(2):111-120.
6. Leonessa F, Clarke R. ATP binding cassette transporters and drug resistance in breast cancer. *Endocr Relat Cancer.* Mar 2003;10(1):43-73.
7. Marie JP, Legrand O. MDR1/P-GP expression as a prognostic factor in acute leukemias. *Adv Exp Med Biol.* 1999;457:1-9.
8. Holzmayer TA, Hilsenbeck S, Von Hoff DD, Roninson IB. Clinical correlates of MDR1 (P-glycoprotein) gene expression in ovarian and small-cell lung carcinomas. *J Natl Cancer Inst.* Oct 7 1992;84(19):1486-1491.
9. Metro G, Fabi A, Russillo M, et al. Taxanes and gemcitabine doublets in the management of HER-2 negative metastatic breast cancer: towards optimization of association and schedule. *Anticancer Res.* Mar-Apr 2008;28(2B):1245-1258.
10. Alberts DS, Marth C, Alvarez RD, et al. Randomized phase 3 trial of interferon gamma-1b plus standard carboplatin/paclitaxel versus carboplatin/paclitaxel alone for first-line treatment of advanced ovarian and primary peritoneal carcinomas: results from a prospectively designed analysis of progression-free survival. *Gynecol Oncol.* May 2008;109(2):174-181.
11. Alt FW, Kellems RE, Bertino JR, Schimke RT. Selective multiplication of dihydrofolate reductase genes in methotrexate-resistant variants of cultured murine cells. *J Biol Chem.* Mar 10 1978;253(5):1357-1370.
12. Horns RC, Jr., Dower WJ, Schimke RT. Gene amplification in a leukemic patient treated with methotrexate. *J Clin Oncol.* Jan 1984;2(1):2-7.
13. Ercikan-Abali EA, Mineishi S, Tong Y, et al. Active site-directed double mutants of dihydrofolate reductase. *Cancer Res.* Sep 15 1996;56(18):4142-4145.
14. Sauerbrey A, McPherson JP, Zhao SC, Banerjee D, Bertino JR. Expression of a novel double-mutant dihydrofolate reductase-cytidine deaminase fusion gene confers resistance to both methotrexate and cytosine arabinoside. *Hum Gene Ther.* Oct 10 1999;10(15):2495-2504.
15. Martinez-Quintanilla J, Cascallo M, Fillat C, Alemany R. Antitumor Therapy Based on Cellular Competition. *Hum Gene Ther.* Mar 12 2009.
16. Tan B, Piwnica-Worms D, Ratner L. Multidrug resistance transporters and modulation. *Curr Opin Oncol.* Sep 2000;12(5):450-458.
17. Rappa G, Lorico A, Flavell RA, Sartorelli AC. Evidence that the multidrug resistance protein (MRP) functions as a co-transporter of glutathione and natural product toxins. *Cancer Res.* Dec 1 1997;57(23):5232-5237.
18. Grant CE, Valdimarsson G, Hipfner DR, Almquist KC, Cole SP, Deeley RG. Overexpression of multidrug resistance-associated protein (MRP) increases resistance to natural product drugs. *Cancer Res.* Jan 15 1994;54(2):357-361.
19. Young LC, Campling BG, Voskoglou-Nomikos T, Cole SP, Deeley RG, Gerlach JH. Expression of multidrug resistance protein-related genes in lung cancer: correlation with drug response. *Clin Cancer Res.* Mar 1999;5(3):673-680.

20. Borst P, Evers R, Kool M, Wijnholds J. A family of drug transporters: the multidrug resistance-associated proteins. *J Natl Cancer Inst.* Aug 16 2000;92(16):1295-1302.
21. Scheper RJ, Broxterman HJ, Scheffer GL, et al. Overexpression of a M(r) 110,000 vesicular protein in non-P-glycoprotein-mediated multidrug resistance. *Cancer Res.* Apr 1 1993;53(7):1475-1479.
22. Ross DD, Karp JE, Chen TT, Doyle LA. Expression of breast cancer resistance protein in blast cells from patients with acute leukemia. *Blood.* Jul 1 2000;96(1):365-368.
23. Fisher GA, Sikic BI. Clinical studies with modulators of multidrug resistance. *Hematol Oncol Clin North Am.* Apr 1995;9(2):363-382.
24. Sikic BI, Fisher GA, Lum BL, Halsey J, Beketic-Oreskovic L, Chen G. Modulation and prevention of multidrug resistance by inhibitors of P-glycoprotein. *Cancer Chemother Pharmacol.* 1997;40 Suppl:S13-19.
25. Chan HS, DeBoer G, Thiessen JJ, et al. Combining cyclosporin with chemotherapy controls intraocular retinoblastoma without requiring radiation. *Clin Cancer Res.* Sep 1996;2(9):1499-1508.
26. te Boekhorst PA, van Kapel J, Schoester M, Sonneveld P. Reversal of typical multidrug resistance by cyclosporin and its non-immunosuppressive analogue SDZ PSC 833 in Chinese hamster ovary cells expressing the mdr1 phenotype. *Cancer Chemother Pharmacol.* 1992;30(3):238-242.
27. Baekelandt M, Lehne G, Trope CG, et al. Phase I/II trial of the multidrug-resistance modulator valspodar combined with cisplatin and doxorubicin in refractory ovarian cancer. *J Clin Oncol.* Jun 15 2001;19(12):2983-2993.
28. Martin C, Berridge G, Mistry P, Higgins C, Charlton P, Callaghan R. The molecular interaction of the high affinity reversal agent XR9576 with P-glycoprotein. *Br J Pharmacol.* Sep 1999;128(2):403-411.
29. Abraham J, Edgerly M, Wilson R, et al. A phase I study of the P-glycoprotein antagonist tariquidar in combination with vinorelbine. *Clin Cancer Res.* May 15 2009;15(10):3574-3582.
30. Bushman FD. Retroviral integration and human gene therapy. *J Clin Invest.* Aug 2007;117(8):2083-2086.
31. Miller AD, Buttimore C. Redesign of retrovirus packaging cell lines to avoid recombination leading to helper virus production. *Mol Cell Biol.* Aug 1986;6(8):2895-2902.
32. Soneoka Y, Cannon PM, Ramsdale EE, et al. A transient three-plasmid expression system for the production of high titer retroviral vectors. *Nucleic Acids Res.* Feb 25 1995;23(4):628-633.
33. Kotin RM, Linden RM, Berns KI. Characterization of a preferred site on human chromosome 19q for integration of adeno-associated virus DNA by non-homologous recombination. *Embo J.* Dec 1992;11(13):5071-5078.
34. Brown MD, Schatzlein AG, Uchegbu IF. Gene delivery with synthetic (non viral) carriers. *Int J Pharm.* Oct 23 2001;229(1-2):1-21.
35. Clark PR, Stopeck AT, Ferrari M, Parker SE, Hersh EM. Studies of direct intratumoral gene transfer using cationic lipid-complexed plasmid DNA. *Cancer Gene Ther.* Jun 2000;7(6):853-860.
36. Neves S, Faneca H, Bertin S, et al. Transferrin lipoplex-mediated suicide gene therapy of oral squamous cell carcinoma in an immunocompetent murine model and mechanisms involved in the antitumoral response. *Cancer Gene Ther.* Jan 2009;16(1):91-101.
37. Monck MA, Mori A, Lee D, et al. Stabilized plasmid-lipid particles: pharmacokinetics and plasmid delivery to distal tumors following intravenous injection. *J Drug Target.* 2000;7(6):439-452.

38. Rait AS, Pirollo KF, Xiang L, Ulick D, Chang EH. Tumor-targeting, systemically delivered antisense HER-2 chemosensitizes human breast cancer xenografts irrespective of HER-2 levels. *Mol Med*. Aug 2002;8(8):475-486.
39. Xu L, Pirollo KF, Tang WH, Rait A, Chang EH. Transferrin-liposome-mediated systemic p53 gene therapy in combination with radiation results in regression of human head and neck cancer xenografts. *Hum Gene Ther*. Dec 10 1999;10(18):2941-2952.
40. Truong-Le VL, Walsh SM, Schweibert E, et al. Gene transfer by DNA-gelatin nanospheres. *Arch Biochem Biophys*. Jan 1 1999;361(1):47-56.
41. Arnedo A, Espuelas S, Irache JM. Albumin nanoparticles as carriers for a phosphodiester oligonucleotide. *Int J Pharm*. Sep 5 2002;244(1-2):59-72.
42. Mao HQ, Roy K, Truong-Le VL, et al. Chitosan-DNA nanoparticles as gene carriers: synthesis, characterization and transfection efficiency. *J Control Release*. Feb 23 2001;70(3):399-421.
43. Reynolds AR, Moein Moghimi S, Hodivala-Dilke K. Nanoparticle-mediated gene delivery to tumour neovasculature. *Trends Mol Med*. Jan 2003;9(1):2-4.
44. Hood JD, Bednarski M, Frausto R, et al. Tumor regression by targeted gene delivery to the neovasculature. *Science*. Jun 28 2002;296(5577):2404-2407.
45. Hood JD, Cheresch DA. Targeted delivery of mutant Raf kinase to neovessels causes tumor regression. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol*. 2002;67:285-291.
46. Jenke BH, Fetzer CP, Stehle IM, et al. An episomally replicating vector binds to the nuclear matrix protein SAF-A in vivo. *EMBO Rep*. Apr 2002;3(4):349-354.
47. Rupprecht S, Lipps HJ. Cell cycle dependent histone dynamics of an episomal non-viral vector. *Gene*. Jun 15 2009;439(1-2):95-101.
48. Piechaczek C, Fetzer C, Baiker A, Bode J, Lipps HJ. A vector based on the SV40 origin of replication and chromosomal S/MARs replicates episomally in CHO cells. *Nucleic Acids Res*. Jan 15 1999;27(2):426-428.
49. Manzini S, Vargiolu A, Stehle IM, et al. Genetically modified pigs produced with a nonviral episomal vector. *Proc Natl Acad Sci U S A*. Nov 21 2006;103(47):17672-17677.
50. Carattoli A, Villa L, Pezzella C, Bordi E, Visca P. Expanding drug resistance through integron acquisition by IncFI plasmids of *Salmonella enterica* Typhimurium. *Emerg Infect Dis*. May-Jun 2001;7(3):444-447.
51. Ivics Z, Hackett PB, Plasterk RH, Izsvak Z. Molecular reconstruction of Sleeping Beauty, a Tc1-like transposon from fish, and its transposition in human cells. *Cell*. Nov 14 1997;91(4):501-510.
52. Hackett PB, Ekker SC, Largaespada DA, McIvor RS. Sleeping beauty transposon-mediated gene therapy for prolonged expression. *Adv Genet*. 2005;54:189-232.
53. Ohlfest JR, Demorest ZL, Motooka Y, et al. Combinatorial antiangiogenic gene therapy by nonviral gene transfer using the sleeping beauty transposon causes tumor regression and improves survival in mice bearing intracranial human glioblastoma. *Mol Ther*. Nov 2005;12(5):778-788.
54. Izsvak Z, Ivics Z, Plasterk RH. Sleeping Beauty, a wide host-range transposon vector for genetic transformation in vertebrates. *J Mol Biol*. Sep 8 2000;302(1):93-102.
55. Song J, Kim C, Ochoa ER. Sleeping Beauty-mediated suicide gene therapy of hepatocellular carcinoma. *Biosci Biotechnol Biochem*. Jan 2009;73(1):165-168.
56. Altaner C. Prodrug cancer gene therapy. *Cancer Lett*. Nov 8 2008;270(2):191-201.
57. Gagandeep S, Brew R, Green B, et al. Prodrug-activated gene therapy: involvement of an immunological component in the "bystander effect". *Cancer Gene Ther*. Mar-Apr 1996;3(2):83-88.
58. Vile RG, Castleden S, Marshall J, Camplejohn R, Upton C, Chong H. Generation of an anti-tumour immune response in a non-immunogenic tumour: HSVtk killing in vivo

- stimulates a mononuclear cell infiltrate and a Th1-like profile of intratumoural cytokine expression. *Int J Cancer*. Apr 10 1997;71(2):267-274.
59. Engelmann C, Heslan JM, Fabre M, Lagarde JP, Klatzmann D, Panis Y. Importance, mechanisms and limitations of the distant bystander effect in cancer gene therapy of experimental liver tumors. *Cancer Lett*. May 8 2002;179(1):59-69.
 60. Agard C, Ligeza C, Dupas B, et al. Immune-dependent distant bystander effect after adenovirus-mediated suicide gene transfer in a rat model of liver colorectal metastasis. *Cancer Gene Ther*. Feb 2001;8(2):128-136.
 61. Khatri A, Zhang B, Doherty E, et al. Combination of cytosine deaminase with uracil phosphoribosyl transferase leads to local and distant bystander effects against RM1 prostate cancer in mice. *J Gene Med*. Sep 2006;8(9):1086-1096.
 62. Kawamura K, Tasaki K, Hamada H, Takenaga K, Sakiyama S, Tagawa M. Expression of *Escherichia coli* uracil phosphoribosyltransferase gene in murine colon carcinoma cells augments the antitumoral effect of 5-fluorouracil and induces protective immunity. *Cancer Gene Ther*. Apr 2000;7(4):637-643.
 63. Brust P, Haubner R, Friedrich A, et al. Comparison of [18F]FHPG and [124/125I]FIAU for imaging herpes simplex virus type 1 thymidine kinase gene expression. *Eur J Nucl Med*. Jun 2001;28(6):721-729.
 64. Moolten FL. Tumor chemosensitivity conferred by inserted herpes thymidine kinase genes: paradigm for a prospective cancer control strategy. *Cancer Res*. Oct 1986;46(10):5276-5281.
 65. Fillat C, Carrio M, Cascante A, Sangro B. Suicide gene therapy mediated by the Herpes Simplex virus thymidine kinase gene/Ganciclovir system: fifteen years of application. *Curr Gene Ther*. Feb 2003;3(1):13-26.
 66. Mahasreshti PJ, Kataram M, Wu H, et al. Ovarian cancer targeted adenoviral-mediated mda-7/IL-24 gene therapy. *Gynecol Oncol*. Mar 2006;100(3):521-532.
 67. Wu H, Han T, Lam JT, et al. Preclinical evaluation of a class of infectivity-enhanced adenoviral vectors in ovarian cancer gene therapy. *Gene Ther*. May 2004;11(10):874-878.
 68. Bouri K, Feero WG, Myerburg MM, et al. Polylysine modification of adenoviral fiber protein enhances muscle cell transduction. *Hum Gene Ther*. Jul 1 1999;10(10):1633-1640.
 69. Page JG, Tian B, Schweikart K, et al. Identifying the safety profile of a novel infectivity-enhanced conditionally replicative adenovirus, Ad5-delta24-RGD, in anticipation of a phase I trial for recurrent ovarian cancer. *Am J Obstet Gynecol*. Apr 2007;196(4):389 e381-389; discussion 389 e389-310.
 70. Black ME, Kokoris MS, Sabo P. Herpes simplex virus-1 thymidine kinase mutants created by semi-random sequence mutagenesis improve prodrug-mediated tumor cell killing. *Cancer Res*. Apr 1 2001;61(7):3022-3026.
 71. Burrows FJ, Gore M, Smiley WR, et al. Purified herpes simplex virus thymidine kinase retroviral particles: III. Characterization of bystander killing mechanisms in transfected tumor cells. *Cancer Gene Ther*. Jan 2002;9(1):87-95.
 72. Cascante A, Huch M, Rodriguez LG, Gonzalez JR, Costantini L, Fillat C. Tat8-TK/GCV suicide gene therapy induces pancreatic tumor regression in vivo. *Hum Gene Ther*. Dec 2005;16(12):1377-1388.
 73. Dilber MS, Phelan A, Aints A, et al. Intercellular delivery of thymidine kinase prodrug activating enzyme by the herpes simplex virus protein, VP22. *Gene Ther*. Jan 1999;6(1):12-21.
 74. Marconi P, Tamura M, Moriuchi S, et al. Connexin 43-enhanced suicide gene therapy using herpesviral vectors. *Mol Ther*. Jan 2000;1(1):71-81.
 75. Robe PA, Jolois O, N'Guyen M, et al. Modulation of the HSV-TK/ganciclovir bystander effect by n-butyrate in glioblastoma: correlation with gap-junction intercellular communication. *Int J Oncol*. Jul 2004;25(1):187-192.

76. Gentry BG, Boucher PD, Shewach DS. Hydroxyurea induces bystander cytotoxicity in cocultures of herpes simplex virus thymidine kinase-expressing and nonexpressing HeLa cells incubated with ganciclovir. *Cancer Res.* Apr 1 2006;66(7):3845-3851.
77. Touraine RL, Vahanian N, Ramsey WJ, Blaese RM. Enhancement of the herpes simplex virus thymidine kinase/ganciclovir bystander effect and its antitumor efficacy in vivo by pharmacologic manipulation of gap junctions. *Hum Gene Ther.* Nov 1 1998;9(16):2385-2391.
78. Pulkkanen KJ, Laukkanen JM, Fuxe J, et al. The combination of HSV-tk and endostatin gene therapy eradicates orthotopic human renal cell carcinomas in nude mice. *Cancer Gene Ther.* Nov 2002;9(11):908-916.
79. Shimizu T, Shimada H, Ochiai T, Hamada H. Enhanced growth suppression in esophageal carcinoma cells using adenovirus-mediated fusion gene transfer (uracil phosphoribosyl transferase and herpes simplex virus thymidine kinase). *Cancer Gene Ther.* Jul 2001;8(7):512-521.
80. Carrio M, Visa J, Cascante A, Estivill X, Fillat C. Intratumoral activation of cyclophosphamide by retroviral transfer of the cytochrome P450 2B1 in a pancreatic tumor model. Combination with the HSVtk/GCV system. *J Gene Med.* Mar-Apr 2002;4(2):141-149.
81. Ardiani A, Sanchez-Bonilla M, Black ME. Fusion enzymes containing HSV-1 thymidine kinase mutants and guanylate kinase enhance prodrug sensitivity in vitro and in vivo. *Cancer Gene Ther.* Feb;17(2):86-96.
82. Hall SJ, Canfield SE, Yan Y, Hassen W, Selleck WA, Chen SH. A novel bystander effect involving tumor cell-derived Fas and FasL interactions following Ad.HSV-tk and Ad.mIL-12 gene therapies in experimental prostate cancer. *Gene Ther.* Apr 2002;9(8):511-517.
83. Goto T, Nishi T, Kobayashi O, et al. Combination electro-gene therapy using herpes virus thymidine kinase and interleukin-12 expression plasmids is highly efficient against murine carcinomas in vivo. *Mol Ther.* Nov 2004;10(5):929-937.
84. Brust D, Feden J, Farnsworth J, Amir C, Broaddus WC, Valerie K. Radiosensitization of rat glioma with bromodeoxycytidine and adenovirus expressing herpes simplex virus-thymidine kinase delivered by slow, rate-controlled positive pressure infusion. *Cancer Gene Ther.* May 2000;7(5):778-788.
85. Boucher PD, Shewach DS. In vitro and in vivo enhancement of ganciclovir-mediated bystander cytotoxicity with gemcitabine. *Mol Ther.* Dec 2005;12(6):1064-1071.
86. Mullen CA, Kilstrup M, Blaese RM. Transfer of the bacterial gene for cytosine deaminase to mammalian cells confers lethal sensitivity to 5-fluorocytosine: a negative selection system. *Proc Natl Acad Sci U S A.* Jan 1 1992;89(1):33-37.
87. Lawrence TS, Rehemtulla A, Ng EY, Wilson M, Trosko JE, Stetson PL. Preferential cytotoxicity of cells transduced with cytosine deaminase compared to bystander cells after treatment with 5-fluorocytosine. *Cancer Res.* Jun 15 1998;58(12):2588-2593.
88. Wang XP, Li ZJ, Magnusson J, Brunicardi FC. Tissue MicroArray analyses of pancreatic duodenal homeobox-1 in human cancers. *World J Surg.* Mar 2005;29(3):334-338.
89. Pandha HS, Martin LA, Rigg A, et al. Genetic prodrug activation therapy for breast cancer: A phase I clinical trial of erbB-2-directed suicide gene expression. *J Clin Oncol.* Jul 1999;17(7):2180-2189.
90. Erbs P, Regulier E, Kintz J, et al. In vivo cancer gene therapy by adenovirus-mediated transfer of a bifunctional yeast cytosine deaminase/uracil phosphoribosyltransferase fusion gene. *Cancer Res.* Jul 15 2000;60(14):3813-3822.
91. Adachi Y, Tamiya T, Ichikawa T, et al. Experimental gene therapy for brain tumors using adenovirus-mediated transfer of cytosine deaminase gene and uracil phosphoribosyltransferase gene with 5-fluorocytosine. *Hum Gene Ther.* Jan 1 2000;11(1):77-89.

92. Chung-Faye GA, Chen MJ, Green NK, et al. In vivo gene therapy for colon cancer using adenovirus-mediated, transfer of the fusion gene cytosine deaminase and uracil phosphoribosyltransferase. *Gene Ther.* Oct 2001;8(20):1547-1554.
93. Kucerova L, Matuskova M, Pastorakova A, et al. Cytosine deaminase expressing human mesenchymal stem cells mediated tumour regression in melanoma bearing mice. *J Gene Med.* Oct 2008;10(10):1071-1082.
94. Cavarretta IT, Altanerova V, Matuskova M, Kucerova L, Culig Z, Altaner C. Adipose Tissue-derived Mesenchymal Stem Cells Expressing Prodrug-converting Enzyme Inhibit Human Prostate Tumor Growth. *Mol Ther.* Oct 20 2009.
95. Bridgewater JA, Springer CJ, Knox RJ, Minton NP, Michael NP, Collins MK. Expression of the bacterial nitroreductase enzyme in mammalian cells renders them selectively sensitive to killing by the prodrug CB1954. *Eur J Cancer.* Dec 1995;31A(13-14):2362-2370.
96. McNeish IA, Green NK, Gilligan MG, et al. Virus directed enzyme prodrug therapy for ovarian and pancreatic cancer using retrovirally delivered E. coli nitroreductase and CB1954. *Gene Ther.* Aug 1998;5(8):1061-1069.
97. Djeha AH, Thomson TA, Leung H, et al. Combined adenovirus-mediated nitroreductase gene delivery and CB1954 treatment: a well-tolerated therapy for established solid tumors. *Mol Ther.* Feb 2001;3(2):233-240.
98. Grove JI, Lovering AL, Guise C, et al. Generation of Escherichia coli nitroreductase mutants conferring improved cell sensitization to the prodrug CB1954. *Cancer Res.* Sep 1 2003;63(17):5532-5537.
99. Green NK, McNeish IA, Doshi R, Searle PF, Kerr DJ, Young LS. Immune enhancement of nitroreductase-induced cytotoxicity: studies using a bicistronic adenovirus vector. *Int J Cancer.* Mar 10 2003;104(1):104-112.
100. Davidoff AN, Mendelow BV. Cell-cycle disruptions and apoptosis induced by the cyclophosphamide derivative mafosfamide. *Exp Hematol.* Jul 1993;21(7):922-927.
101. Huch M, Abate-Daga D, Roig JM, et al. Targeting the CYP2B 1/cyclophosphamide suicide system to fibroblast growth factor receptors results in a potent antitumoral response in pancreatic cancer models. *Hum Gene Ther.* Dec 2006;17(12):1187-1200.
102. Huch M, Abate-Daga D, Roig JM, et al. Targeting the CYP2B1/Cyclophosphamide Suicide System to Fibroblast Growth Factor Receptors Results in a Potent Antitumoral Response in Pancreatic Cancer Models. *Hum Gene Ther.* Oct 26 2006.
103. Karle P, Renner M, Salmons B, Gunzburg WH. Necrotic, rather than apoptotic, cell death caused by cytochrome P450-activated ifosfamide. *Cancer Gene Ther.* Mar 2001;8(3):220-230.
104. Rainov NG. A phase III clinical evaluation of herpes simplex virus type 1 thymidine kinase and ganciclovir gene therapy as an adjuvant to surgical resection and radiation in adults with previously untreated glioblastoma multiforme. *Hum Gene Ther.* Nov 20 2000;11(17):2389-2401.
105. Alvarez RD, Gomez-Navarro J, Wang M, et al. Adenoviral-mediated suicide gene therapy for ovarian cancer. *Mol Ther.* Nov 2000;2(5):524-530.
106. Serman DH, Recio A, Vachani A, et al. Long-term follow-up of patients with malignant pleural mesothelioma receiving high-dose adenovirus herpes simplex thymidine kinase/ganciclovir suicide gene therapy. *Clin Cancer Res.* Oct 15 2005;11(20):7444-7453.
107. Nasu Y, Saika T, Ebara S, et al. Suicide gene therapy with adenoviral delivery of HSV-tK gene for patients with local recurrence of prostate cancer after hormonal therapy. *Mol Ther.* Apr 2007;15(4):834-840.
108. Freytag SO, Stricker H, Peabody J, et al. Five-year follow-up of trial of replication-competent adenovirus-mediated suicide gene therapy for treatment of prostate cancer. *Mol Ther.* Mar 2007;15(3):636-642.

109. Colombo F, Barzon L, Franchin E, et al. Combined HSV-TK/IL-2 gene therapy in patients with recurrent glioblastoma multiforme: biological and clinical results. *Cancer Gene Ther.* Oct 2005;12(10):835-848.
110. Lohr M, Hoffmeyer A, Kroger J, et al. Microencapsulated cell-mediated treatment of inoperable pancreatic carcinoma. *Lancet.* May 19 2001;357(9268):1591-1592.
111. Chevez-Barrios P, Chintagumpala M, Mieler W, et al. Response of retinoblastoma with vitreous tumor seeding to adenovirus-mediated delivery of thymidine kinase followed by ganciclovir. *J Clin Oncol.* Nov 1 2005;23(31):7927-7935.
112. Puumalainen AM, Vapalahti M, Agrawal RS, et al. Beta-galactosidase gene transfer to human malignant glioma in vivo using replication-deficient retroviruses and adenoviruses. *Hum Gene Ther.* Aug 10 1998;9(12):1769-1774.
113. Immonen A, Vapalahti M, Tyynela K, et al. AdvHSV-tk gene therapy with intravenous ganciclovir improves survival in human malignant glioma: a randomised, controlled study. *Mol Ther.* Nov 2004;10(5):967-972.
114. Freytag SO, Movsas B, Aref I, et al. Phase I trial of replication-competent adenovirus-mediated suicide gene therapy combined with IMRT for prostate cancer. *Mol Ther.* May 2007;15(5):1016-1023.
115. Rainov NG, Ren H. Clinical trials with retrovirus mediated gene therapy--what have we learned? *J Neurooncol.* Dec 2003;65(3):227-236.
116. Freeman SM, Abboud CN, Whartenby KA, et al. The "bystander effect": tumor regression when a fraction of the tumor mass is genetically modified. *Cancer Res.* Nov 1 1993;53(21):5274-5283.
117. Sandmair AM, Turunen M, Tyynela K, et al. Herpes simplex virus thymidine kinase gene therapy in experimental rat BT4C glioma model: effect of the percentage of thymidine kinase-positive glioma cells on treatment effect, survival time, and tissue reactions. *Cancer Gene Ther.* Mar 2000;7(3):413-421.
118. Martinez-Quintanilla J, Cascallo M, Gros A, Fillat C, Alemany R. Positive selection of gene-modified cells increases the efficacy of pancreatic cancer suicide gene therapy. *Mol Cancer Ther.* Nov 2009;8(11):3098-3107.
119. Harsh GR, Deisboeck TS, Louis DN, et al. Thymidine kinase activation of ganciclovir in recurrent malignant gliomas: a gene-marking and neuropathological study. *J Neurosurg.* May 2000;92(5):804-811.
120. Long Z, Lu P, Grooms T, et al. Molecular evaluation of biopsy and autopsy specimens from patients receiving in vivo retroviral gene therapy. *Hum Gene Ther.* Mar 20 1999;10(5):733-740.
121. Cascante A, Abate-Daga D, Garcia-Rodriguez L, Gonzalez JR, Alemany R, Fillat C. GCV modulates the antitumoural efficacy of a replicative adenovirus expressing the Tat8-TK as a late gene in a pancreatic tumour model. *Gene Ther.* Oct 2007;14(20):1471-1480.
122. Ram Z, Culver KW, Oshiro EM, et al. Therapy of malignant brain tumors by intratumoral implantation of retroviral vector-producing cells. *Nat Med.* Dec 1997;3(12):1354-1361.
123. Klatzmann D, Valery CA, Bensimon G, et al. A phase I/II study of herpes simplex virus type 1 thymidine kinase "suicide" gene therapy for recurrent glioblastoma. Study Group on Gene Therapy for Glioblastoma. *Hum Gene Ther.* Nov 20 1998;9(17):2595-2604.
124. Herman JR, Adler HL, Aguilar-Cordova E, et al. In situ gene therapy for adenocarcinoma of the prostate: a phase I clinical trial. *Hum Gene Ther.* May 1 1999;10(7):1239-1249.
125. Shand N, Weber F, Mariani L, et al. A phase 1-2 clinical trial of gene therapy for recurrent glioblastoma multiforme by tumor transduction with the herpes simplex thymidine kinase gene followed by ganciclovir. GLI328 European-Canadian Study Group. *Hum Gene Ther.* Sep 20 1999;10(14):2325-2335.

126. Trask TW, Trask RP, Aguilar-Cordova E, et al. Phase I study of adenoviral delivery of the HSV-tk gene and ganciclovir administration in patients with current malignant brain tumors. *Mol Ther.* Feb 2000;1(2):195-203.
127. Sung MW, Yeh HC, Thung SN, et al. Intratumoral adenovirus-mediated suicide gene transfer for hepatic metastases from colorectal adenocarcinoma: results of a phase I clinical trial. *Mol Ther.* Sep 2001;4(3):182-191.
128. Hasenburg A, Tong XW, Fischer DC, et al. Adenovirus-mediated thymidine kinase gene therapy in combination with topotecan for patients with recurrent ovarian cancer: 2.5-year follow-up. *Gynecol Oncol.* Dec 2001;83(3):549-554.
129. Freytag SO, Stricker H, Pegg J, et al. Phase I study of replication-competent adenovirus-mediated double-suicide gene therapy in combination with conventional-dose three-dimensional conformal radiation therapy for the treatment of newly diagnosed, intermediate- to high-risk prostate cancer. *Cancer Res.* Nov 1 2003;63(21):7497-7506.
130. Palmer DH, Mautner V, Mirza D, et al. Virus-directed enzyme prodrug therapy: intratumoral administration of a replication-deficient adenovirus encoding nitroreductase to patients with resectable liver cancer. *J Clin Oncol.* May 1 2004;22(9):1546-1552.
131. Braybrooke JP, Slade A, Deplanque G, et al. Phase I study of MetXia-P450 gene therapy and oral cyclophosphamide for patients with advanced breast cancer or melanoma. *Clin Cancer Res.* Feb 15 2005;11(4):1512-1520.
132. Barton KN, Stricker H, Brown SL, et al. Phase I study of noninvasive imaging of adenovirus-mediated gene expression in the human prostate. *Mol Ther.* Oct 2008;16(10):1761-1769.
133. Patel P, Young JG, Mautner V, et al. A phase I/II clinical trial in localized prostate cancer of an adenovirus expressing nitroreductase with CB1954 [correction of CB1984]. *Mol Ther.* Jul 2009;17(7):1292-1299.
134. Saukkonen K, Hemminki A. Tissue-specific promoters for cancer gene therapy. *Expert Opin Biol Ther.* May 2004;4(5):683-696.
135. Kidd S, Spaeth E, Dembinski JL, et al. Direct evidence of mesenchymal stem cell tropism for tumor and wounding microenvironments using in vivo bioluminescent imaging. *Stem Cells.* Oct 2009;27(10):2614-2623.
136. Kucerova L, Altanerova V, Matuskova M, Tyciakova S, Altaner C. Adipose tissue-derived human mesenchymal stem cells mediated prodrug cancer gene therapy. *Cancer Res.* Jul 1 2007;67(13):6304-6313.
137. Purves D. Neuronal competition. *Nature.* Oct 16 1980;287(5783):585-586.
138. Raff MC. Social controls on cell survival and cell death. *Nature.* Apr 2 1992;356(6368):397-400.
139. Morata G, Ripoll P. Minutes: mutants of drosophila autonomously affecting cell division rate. *Dev Biol.* Feb 1975;42(2):211-221.
140. Moreno E, Basler K, Morata G. Cells compete for decapentaplegic survival factor to prevent apoptosis in Drosophila wing development. *Nature.* Apr 18 2002;416(6882):755-759.
141. Moreno E. Is cell competition relevant to cancer? *Nat Rev Cancer.* Feb 2008;8(2):141-147.
142. Oliver ER, Saunders TL, Tarle SA, Glaser T. Ribosomal protein L24 defect in belly spot and tail (Bst), a mouse Minute. *Development.* Aug 2004;131(16):3907-3920.
143. Diaz B, Moreno E. The competitive nature of cells. *Exp Cell Res.* Jun 10 2005;306(2):317-322.
144. Sancho E, Batlle E, Clevers H. Live and let die in the intestinal epithelium. *Curr Opin Cell Biol.* Dec 2003;15(6):763-770.
145. Moreno E, Basler K. dMyc transforms cells into super-competitors. *Cell.* Apr 2 2004;117(1):117-129.

146. Baker NE, Li W. Cell competition and its possible relation to cancer. *Cancer Res.* Jul 15 2008;68(14):5505-5507.
147. Abrams JM. Competition and compensation: coupled to death in development and cancer. *Cell.* Aug 23 2002;110(4):403-406.
148. Albini A, Sporn MB. The tumour microenvironment as a target for chemoprevention. *Nat Rev Cancer.* Feb 2007;7(2):139-147.
149. Spaeth EL, Dembinski JL, Sasser AK, et al. Mesenchymal stem cell transition to tumor-associated fibroblasts contributes to fibrovascular network expansion and tumor progression. *PLoS One.* 2009;4(4):e4992.
150. Cavazzana-Calvo M, Hacein-Bey S, de Saint Basile G, et al. Gene therapy of human severe combined immunodeficiency (SCID)-X1 disease. *Science.* Apr 28 2000;288(5466):669-672.
151. Aiuti A, Slavin S, Aker M, et al. Correction of ADA-SCID by stem cell gene therapy combined with nonmyeloablative conditioning. *Science.* Jun 28 2002;296(5577):2410-2413.
152. Sauvageau G, Thorsteinsdottir U, Eaves CJ, et al. Overexpression of HOXB4 in hematopoietic cells causes the selective expansion of more primitive populations in vitro and in vivo. *Genes Dev.* Jul 15 1995;9(14):1753-1765.
153. Antonchuk J, Sauvageau G, Humphries RK. HOXB4-induced expansion of adult hematopoietic stem cells ex vivo. *Cell.* Apr 5 2002;109(1):39-45.
154. Zhang XB, Beard BC, Beebe K, Storer B, Humphries RK, Kiem HP. Differential effects of HOXB4 on nonhuman primate short- and long-term repopulating cells. *PLoS Med.* May 2006;3(5):e173.
155. Sorrentino BP. Gene therapy to protect haematopoietic cells from cytotoxic cancer drugs. *Nat Rev Cancer.* Jun 2002;2(6):431-441.
156. Weiss RB. Introduction: dose-intensive therapy for adult malignancies. *Semin Oncol.* Feb 1999;26(1):1-5.
157. James RI, Warlick CA, Diers MD, Gunther R, McIvor RS. Mild preconditioning and low-level engraftment confer methotrexate resistance in mice transplanted with marrow expressing drug-resistant dihydrofolate reductase activity. *Blood.* Aug 15 2000;96(4):1334-1341.
158. Allay JA, Persons DA, Galipeau J, et al. In vivo selection of retrovirally transduced hematopoietic stem cells. *Nat Med.* Oct 1998;4(10):1136-1143.
159. Meisel R, Bardenheuer W, Strehblow C, et al. Efficient protection from methotrexate toxicity and selection of transduced human hematopoietic cells following gene transfer of dihydrofolate reductase mutants. *Exp Hematol.* Dec 2003;31(12):1215-1222.
160. Licht T, Haskins M, Henthorn P, et al. Drug selection with paclitaxel restores expression of linked IL-2 receptor gamma -chain and multidrug resistance (MDR1) transgenes in canine bone marrow. *Proc Natl Acad Sci U S A.* Mar 5 2002;99(5):3123-3128.
161. Abonour R, Williams DA, Einhorn L, et al. Efficient retrovirus-mediated transfer of the multidrug resistance 1 gene into autologous human long-term repopulating hematopoietic stem cells. *Nat Med.* Jun 2000;6(6):652-658.
162. Bunting KD, Galipeau J, Topham D, Benaim E, Sorrentino BP. Transduction of murine bone marrow cells with an MDR1 vector enables ex vivo stem cell expansion, but these expanded grafts cause a myeloproliferative syndrome in transplanted mice. *Blood.* Oct 1 1998;92(7):2269-2279.
163. Bunting KD, Zhou S, Lu T, Sorrentino BP. Enforced P-glycoprotein pump function in murine bone marrow cells results in expansion of side population stem cells in vitro and repopulating cells in vivo. *Blood.* Aug 1 2000;96(3):902-909.
164. Sorrentino BP, Brandt SJ, Bodine D, et al. Selection of drug-resistant bone marrow cells in vivo after retroviral transfer of human MDR1. *Science.* Jul 3 1992;257(5066):99-103.

165. Podda S, Ward M, Himelstein A, et al. Transfer and expression of the human multiple drug resistance gene into live mice. *Proc Natl Acad Sci U S A*. Oct 15 1992;89(20):9676-9680.
166. Sugimoto Y, Hrycyna CA, Aksentijevich II, Pastan II, Gottesman MM. Coexpression of a multidrug-resistance gene (MDR1) and herpes simplex virus thymidine kinase gene as part of a bicistronic messenger RNA in a retrovirus vector allows selective killing of MDR1-transduced cells. *Clin Cancer Res*. Apr 1995;1(4):447-457.
167. Mayer-Kuckuk P, Banerjee D, Malhotra S, et al. Cells exposed to antifolates show increased cellular levels of proteins fused to dihydrofolate reductase: a method to modulate gene expression. *Proc Natl Acad Sci U S A*. Mar 19 2002;99(6):3400-3405.
168. Mayer-Kuckuk P, Doubrovin M, Gusani NJ, et al. Imaging of dihydrofolate reductase fusion gene expression in xenografts of human liver metastases of colorectal cancer in living rats. *Eur J Nucl Med Mol Imaging*. Sep 2003;30(9):1281-1291.
169. Caplan AI. Mesenchymal stem cells. *J Orthop Res*. Sep 1991;9(5):641-650.
170. Evans MJ, Kaufman MH. Establishment in culture of pluripotential cells from mouse embryos. *Nature*. Jul 9 1981;292(5819):154-156.
171. Martin GR. Isolation of a pluripotent cell line from early mouse embryos cultured in medium conditioned by teratocarcinoma stem cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*. Dec 1981;78(12):7634-7638.
172. Thomson JA, Itskovitz-Eldor J, Shapiro SS, et al. Embryonic stem cell lines derived from human blastocysts. *Science*. Nov 6 1998;282(5391):1145-1147.
173. Thomas ED, Ferrebee JW. Irradiation and marrow transplantation: studies in Cooperstown. *Lancet*. Jun 11 1960;1(7137):1289-1290.
174. da Silva Meirelles L, Chagastelles PC, Nardi NB. Mesenchymal stem cells reside in virtually all post-natal organs and tissues. *J Cell Sci*. Jun 1 2006;119(Pt 11):2204-2213.
175. Zuk PA, Zhu M, Mizuno H, et al. Multilineage cells from human adipose tissue: implications for cell-based therapies. *Tissue Eng*. Apr 2001;7(2):211-228.
176. Williams JT, Southerland SS, Souza J, Calcutt AF, Cartledge RG. Cells isolated from adult human skeletal muscle capable of differentiating into multiple mesodermal phenotypes. *Am Surg*. Jan 1999;65(1):22-26.
177. Campagnoli C, Roberts IA, Kumar S, Bennett PR, Bellantuono I, Fisk NM. Identification of mesenchymal stem/progenitor cells in human first-trimester fetal blood, liver, and bone marrow. *Blood*. Oct 15 2001;98(8):2396-2402.
178. Fan CG, Tang FW, Zhang QJ, et al. Characterization and neural differentiation of fetal lung mesenchymal stem cells. *Cell Transplant*. 2005;14(5):311-321.
179. Kim SU, Nakagawa E, Hatori K, Nagai A, Lee MA, Bang JH. Production of immortalized human neural crest stem cells. *Methods Mol Biol*. 2002;198:55-65.
180. Friedenstein AJ, Gorskaja JF, Kulagina NN. Fibroblast precursors in normal and irradiated mouse hematopoietic organs. *Exp Hematol*. Sep 1976;4(5):267-274.
181. Kern S, Eichler H, Stoeve J, Kluter H, Bieback K. Comparative analysis of mesenchymal stem cells from bone marrow, umbilical cord blood, or adipose tissue. *Stem Cells*. May 2006;24(5):1294-1301.
182. Chan J, O'Donoghue K, de la Fuente J, et al. Human fetal mesenchymal stem cells as vehicles for gene delivery. *Stem Cells*. 2005;23(1):93-102.
183. Dominici M, Le Blanc K, Mueller I, et al. Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement. *Cytotherapy*. 2006;8(4):315-317.
184. Peister A, Mellad JA, Larson BL, Hall BM, Gibson LF, Prockop DJ. Adult stem cells from bone marrow (MSCs) isolated from different strains of inbred mice vary in surface epitopes, rates of proliferation, and differentiation potential. *Blood*. Mar 1 2004;103(5):1662-1668.

185. Baddoo M, Hill K, Wilkinson R, et al. Characterization of mesenchymal stem cells isolated from murine bone marrow by negative selection. *J Cell Biochem.* Aug 15 2003;89(6):1235-1249.
186. Javazon EH, Beggs KJ, Flake AW. Mesenchymal stem cells: paradoxes of passaging. *Exp Hematol.* May 2004;32(5):414-425.
187. Mizuno H, Zuk PA, Zhu M, Lorenz HP, Benhaim P, Hedrick MH. Myogenic differentiation by human processed lipoaspirate cells. *Plast Reconstr Surg.* Jan 2002;109(1):199-209; discussion 210-191.
188. Pittenger MF, Martin BJ. Mesenchymal stem cells and their potential as cardiac therapeutics. *Circ Res.* Jul 9 2004;95(1):9-20.
189. Hardy SA, Maltman DJ, Przyborski SA. Mesenchymal stem cells as mediators of neural differentiation. *Curr Stem Cell Res Ther.* Jan 2008;3(1):43-52.
190. Zuk PA, Zhu M, Ashjian P, et al. Human adipose tissue is a source of multipotent stem cells. *Mol Biol Cell.* Dec 2002;13(12):4279-4295.
191. Izadpanah R, Trygg C, Patel B, et al. Biologic properties of mesenchymal stem cells derived from bone marrow and adipose tissue. *J Cell Biochem.* Dec 1 2006;99(5):1285-1297.
192. Schaffler A, Buchler C. Concise review: adipose tissue-derived stromal cells--basic and clinical implications for novel cell-based therapies. *Stem Cells.* Apr 2007;25(4):818-827.
193. O'Donoghue K, Choolani M, Chan J, et al. Identification of fetal mesenchymal stem cells in maternal blood: implications for non-invasive prenatal diagnosis. *Mol Hum Reprod.* Aug 2003;9(8):497-502.
194. Hurelbrink CB, Tyers P, Armstrong RJ, Dunnett SB, Barker RA, Rosser AE. Long-term hibernation of human fetal striatal tissue does not adversely affect its differentiation in vitro or graft survival: implications for clinical trials in Huntington's disease. *Cell Transplant.* 2003;12(7):687-695.
195. Moreno R. *Transferencia génica fetal en un modelo de coneja gestante. Optimización de vectores retrovirales para una mayor eficiencia, seguridad y persistencia de la expresión transgénica.* Barcelona: Departament de Bioquímica i Biologia Molecular, Universitat de Barcelona; 2008.
196. Moreno R, Martinez-Gonzalez I, Rosal M, Farwati A, Gratacos E, Aran JM. Characterization of mesenchymal stem cells isolated from the rabbit fetal liver. *Stem Cells Dev.* Feb 11.
197. Gotherstrom C, Ringden O, Tammik C, Zetterberg E, Westgren M, Le Blanc K. Immunologic properties of human fetal mesenchymal stem cells. *Am J Obstet Gynecol.* Jan 2004;190(1):239-245.
198. Le Blanc K, Ringden O. Immunobiology of human mesenchymal stem cells and future use in hematopoietic stem cell transplantation. *Biol Blood Marrow Transplant.* May 2005;11(5):321-334.
199. Gonzalez-Rey E, Gonzalez MA, Varela N, et al. Human adipose-derived mesenchymal stem cells reduce inflammatory and T cell responses and induce regulatory T cells in vitro in rheumatoid arthritis. *Ann Rheum Dis.* Jan;69(1):241-248.
200. Gonzalez MA, Gonzalez-Rey E, Rico L, Buscher D, Delgado M. Adipose-derived mesenchymal stem cells alleviate experimental colitis by inhibiting inflammatory and autoimmune responses. *Gastroenterology.* Mar 2009;136(3):978-989.
201. Gonzalez MA, Gonzalez-Rey E, Rico L, Buscher D, Delgado M. Treatment of experimental arthritis by inducing immune tolerance with human adipose-derived mesenchymal stem cells. *Arthritis Rheum.* Apr 2009;60(4):1006-1019.
202. Gonzalez-Rey E, Anderson P, Gonzalez MA, Rico L, Buscher D, Delgado M. Human adult stem cells derived from adipose tissue protect against experimental colitis and sepsis. *Gut.* Jul 2009;58(7):929-939.

203. Sasaki M, Abe R, Fujita Y, Ando S, Inokuma D, Shimizu H. Mesenchymal stem cells are recruited into wounded skin and contribute to wound repair by transdifferentiation into multiple skin cell type. *J Immunol*. Feb 15 2008;180(4):2581-2587.
204. Stappenbeck TS, Miyoshi H. The role of stromal stem cells in tissue regeneration and wound repair. *Science*. Jun 26 2009;324(5935):1666-1669.
205. Wu Y, Chen L, Scott PG, Tredget EE. Mesenchymal stem cells enhance wound healing through differentiation and angiogenesis. *Stem Cells*. Oct 2007;25(10):2648-2659.
206. Salazar KD, Lankford SM, Brody AR. Mesenchymal stem cells produce Wnt isoforms and TGF-beta1 that mediate proliferation and procollagen expression by lung fibroblasts. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*. Nov 2009;297(5):L1002-1011.
207. Bainbridge JW. Prospects for gene therapy of inherited retinal disease. *Eye (Lond)*. Oct 2009;23(10):1898-1903.
208. Horwitz EM, Gordon PL, Koo WK, et al. Isolated allogeneic bone marrow-derived mesenchymal cells engraft and stimulate growth in children with osteogenesis imperfecta: Implications for cell therapy of bone. *Proc Natl Acad Sci U S A*. Jun 25 2002;99(13):8932-8937.
209. Lopez-Barneo J, Pardal R, Ortega-Saenz P, Duran R, Villadiego J, Toledo-Aral JJ. The neurogenic niche in the carotid body and its applicability to antiparkinsonian cell therapy. *J Neural Transm*. Aug 2009;116(8):975-982.
210. Ortiz LA, Gambelli F, McBride C, et al. Mesenchymal stem cell engraftment in lung is enhanced in response to bleomycin exposure and ameliorates its fibrotic effects. *Proc Natl Acad Sci U S A*. Jul 8 2003;100(14):8407-8411.
211. Wennersten A, Meier X, Holmin S, Wahlberg L, Mathiesen T. Proliferation, migration, and differentiation of human neural stem/progenitor cells after transplantation into a rat model of traumatic brain injury. *J Neurosurg*. Jan 2004;100(1):88-96.
212. Minguell JJ, Erices A. Mesenchymal stem cells and the treatment of cardiac disease. *Exp Biol Med (Maywood)*. Jan 2006;231(1):39-49.
213. Kunter U, Rong S, Boor P, et al. Mesenchymal stem cells prevent progressive experimental renal failure but maldifferentiate into glomerular adipocytes. *J Am Soc Nephrol*. Jun 2007;18(6):1754-1764.
214. Lee RH, Seo MJ, Reger RL, et al. Multipotent stromal cells from human marrow home to and promote repair of pancreatic islets and renal glomeruli in diabetic NOD/scid mice. *Proc Natl Acad Sci U S A*. Nov 14 2006;103(46):17438-17443.
215. Ringden O, Uzunel M, Rasmusson I, et al. Mesenchymal stem cells for treatment of therapy-resistant graft-versus-host disease. *Transplantation*. May 27 2006;81(10):1390-1397.
216. Barrientos S, Stojadinovic O, Golinko MS, Brem H, Tomic-Canic M. Growth factors and cytokines in wound healing. *Wound Repair Regen*. Sep-Oct 2008;16(5):585-601.
217. Dvorak HF. Tumors: wounds that do not heal. Similarities between tumor stroma generation and wound healing. *N Engl J Med*. Dec 25 1986;315(26):1650-1659.
218. Klopp AH, Spaeth EL, Dembinski JL, et al. Tumor irradiation increases the recruitment of circulating mesenchymal stem cells into the tumor microenvironment. *Cancer Res*. Dec 15 2007;67(24):11687-11695.
219. Kidd S, Spaeth E, Klopp A, Andreeff M, Hall B, Marini FC. The (in) auspicious role of mesenchymal stromal cells in cancer: be it friend or foe. *Cytotherapy*. 2008;10(7):657-667.
220. Studený M, Marini FC, Dembinski JL, et al. Mesenchymal stem cells: potential precursors for tumor stroma and targeted-delivery vehicles for anticancer agents. *J Natl Cancer Inst*. Nov 3 2004;96(21):1593-1603.
221. Kim SK, Cargioli TG, Machluf M, et al. PEX-producing human neural stem cells inhibit tumor growth in a mouse glioma model. *Clin Cancer Res*. Aug 15 2005;11(16):5965-5970.

222. Stagg J, Lejeune L, Paquin A, Galipeau J. Marrow stromal cells for interleukin-2 delivery in cancer immunotherapy. *Hum Gene Ther.* Jun 2004;15(6):597-608.
223. Yong RL, Shinojima N, Fueyo J, et al. Human bone marrow-derived mesenchymal stem cells for intravascular delivery of oncolytic adenovirus Delta24-RGD to human gliomas. *Cancer Res.* Dec 1 2009;69(23):8932-8940.
224. Sugimoto Y, Aksentijevich I, Murray GJ, Brady RO, Pastan I, Gottesman MM. Retroviral coexpression of a multidrug resistance gene (MDR1) and human alpha-galactosidase A for gene therapy of Fabry disease. *Hum Gene Ther.* Jul 1995;6(7):905-915.
225. Sugimoto Y, Tsukahara S, Sato S, et al. Drug-selected co-expression of P-glycoprotein and gp91 in vivo from an MDR1-bicistronic retrovirus vector Ha-MDR-IRES-gp91. *J Gene Med.* May 2003;5(5):366-376.
226. Zaboikin M, Srinivasakumar N, Schuening F. Gene therapy with drug resistance genes. *Cancer Gene Ther.* Apr 2006;13(4):335-345.
227. Richard E, Geronimi F, Lalanne M, et al. A bicistronic SIN-lentiviral vector containing G156A MGMT allows selection and metabolic correction of hematopoietic protoporphyric cell lines. *J Gene Med.* Sep 2003;5(9):737-747.
228. Havenga MJ, Werner AB, Valerio D, van Es HH. Methotrexate selectable retroviral vectors for Gaucher disease. *Gene Ther.* Oct 1998;5(10):1379-1388.
229. Siegel RL, Jemal A, Ward EM. Increase in incidence of colorectal cancer among young men and women in the United States. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* Jun 2009;18(6):1695-1698.
230. Jemal A, Siegel R, Ward E, Hao Y, Xu J, Thun MJ. Cancer statistics, 2009. *CA Cancer J Clin.* Jul-Aug 2009;59(4):225-249.
231. Kurkjian C, Kummar S. Advances in the treatment of metastatic colorectal cancer. *Am J Ther.* Sep-Oct 2009;16(5):412-420.
232. Link CJ, Jr., Levy JP, McCann LZ, Moorman DW. Gene therapy for colon cancer with the herpes simplex thymidine kinase gene. *J Surg Oncol.* Apr 1997;64(4):289-294.
233. Patel M, Sleep SE, Lewis WS, et al. Comparison of the protection of cells from antifolates by transduced human dihydrofolate reductase mutants. *Hum Gene Ther.* Nov 20 1997;8(17):2069-2077.
234. Fotoohi AK, Albertioni F. Mechanisms of antifolate resistance and methotrexate efficacy in leukemia cells. *Leuk Lymphoma.* Mar 2008;49(3):410-426.
235. Balaban EP, Graham M, Perkins S, et al. Double modulation of 5-fluorouracil in the treatment of advanced colorectal carcinoma: report of a trial with sequential methotrexate, intravenous (loading dose) folinic acid, 5-fluorouracil, and a literature review. *Cancer Invest.* 1994;12(1):12-19.
236. Konishi T, Noie T, Abe T, et al. [Improving the anti-tumor activity of 5-fluorouracil by methotrexate]. *Gan To Kagaku Ryoho.* Mar 1999;26(4):431-439.
237. Stabuc B, Markovic A, Plesnicar A, Cizej TE. Double modulation of 5-fluorouracil by leucovorin and low-dose methotrexate in advanced colorectal cancer. *Neoplasma.* 2000;47(4):248-252.
238. Matsumura Y, Haruyama K, Hamaguchi T, et al. Effect of a 3-hour interval between methotrexate and 5-fluorouracil in the treatment of metastatic colorectal cancer. *Jpn J Clin Oncol.* Jan 2002;32(1):9-13.
239. Mineishi S, Nakahara S, Takebe N, Banerjee D, Zhao SC, Bertino JR. Co-expression of the herpes simplex virus thymidine kinase gene potentiates methotrexate resistance conferred by transfer of a mutated dihydrofolate reductase gene. *Gene Ther.* Jun 1997;4(6):570-576.
240. Romig H, Fackelmayer FO, Renz A, Ramsperger U, Richter A. Characterization of SAF-A, a novel nuclear DNA binding protein from HeLa cells with high affinity for nuclear matrix/scaffold attachment DNA elements. *Embo J.* Sep 1992;11(9):3431-3440.

241. Huber BE, Austin EA, Richards CA, Davis ST, Good SS. Metabolism of 5-fluorocytosine to 5-fluorouracil in human colorectal tumor cells transduced with the cytosine deaminase gene: significant antitumor effects when only a small percentage of tumor cells express cytosine deaminase. *Proc Natl Acad Sci U S A*. Aug 16 1994;91(17):8302-8306.
242. Koyama F, Sawada H, Hirao T, Fujii H, Hamada H, Nakano H. Combined suicide gene therapy for human colon cancer cells using adenovirus-mediated transfer of escherichia coli cytosine deaminase gene and Escherichia coli uracil phosphoribosyltransferase gene with 5-fluorocytosine. *Cancer Gene Ther*. Jul 2000;7(7):1015-1022.
243. Crystal RG, Hirschowitz E, Lieberman M, et al. Phase I study of direct administration of a replication deficient adenovirus vector containing the E. coli cytosine deaminase gene to metastatic colon carcinoma of the liver in association with the oral administration of the pro-drug 5-fluorocytosine. *Hum Gene Ther*. May 20 1997;8(8):985-1001.
244. Harvey BG, Maroni J, O'Donoghue KA, et al. Safety of local delivery of low- and intermediate-dose adenovirus gene transfer vectors to individuals with a spectrum of morbid conditions. *Hum Gene Ther*. Jan 1 2002;13(1):15-63.
245. Heinemann V. Gemcitabine: progress in the treatment of pancreatic cancer. *Oncology*. 2001;60(1):8-18.
246. Chua YJ, Cunningham D. Chemotherapy for advanced pancreatic cancer. *Best Pract Res Clin Gastroenterol*. Apr 2006;20(2):327-348.
247. Heinemann V. [Medical-oncological aspects in the treatment of pancreatic cancer]. *Radiologe*. Feb 2009;49(2):144-148.
248. Wang J, Lu XX, Chen DZ, Li SF, Zhang LS. Herpes simplex virus thymidine kinase and ganciclovir suicide gene therapy for human pancreatic cancer. *World J Gastroenterol*. Feb 1 2004;10(3):400-403.
249. Carrio M, Romagosa A, Mercade E, et al. Enhanced pancreatic tumor regression by a combination of adenovirus and retrovirus-mediated delivery of the herpes simplex virus thymidine kinase gene. *Gene Ther*. Apr 1999;6(4):547-553.
250. Zischek C, Niess H, Ischenko I, et al. Targeting tumor stroma using engineered mesenchymal stem cells reduces the growth of pancreatic carcinoma. *Ann Surg*. Nov 2009;250(5):747-753.
251. Leslie EM, Deeley RG, Cole SP. Multidrug resistance proteins: role of P-glycoprotein, MRP1, MRP2, and BCRP (ABCG2) in tissue defense. *Toxicol Appl Pharmacol*. May 1 2005;204(3):216-237.
252. Jensen PB, Holm B, Sorensen M, Christensen IJ, Sehested M. In vitro cross-resistance and collateral sensitivity in seven resistant small-cell lung cancer cell lines: preclinical identification of suitable drug partners to taxotere, taxol, topotecan and gemcitabin. *Br J Cancer*. 1997;75(6):869-877.
253. Bergman AM, Pinedo HM, Talianidis I, et al. Increased sensitivity to gemcitabine of P-glycoprotein and multidrug resistance-associated protein-overexpressing human cancer cell lines. *Br J Cancer*. Jun 16 2003;88(12):1963-1970.
254. Nishiyama M, Wada S. Docetaxel: its role in current and future treatments for advanced gastric cancer. *Gastric Cancer*. 2009;12(3):132-141.
255. Chiuri VE, Silvestris N, Lorusso V, Tinelli A. Efficacy and safety of the combination of docetaxel (Taxotere) with targeted therapies in the treatment of solid malignancies. *Curr Drug Targets*. Oct 2009;10(10):982-1000.
256. Caponigro F, Longo F, Perri F, Ionna F. Docetaxel in the management of head and neck cancer. *Anticancer Drugs*. Sep 2009;20(8):639-645.
257. Jereczek-Fossa BA, Curigliano G, Orecchia R. Systemic therapies for non-metastatic prostate cancer: review of the literature. *Onkologie*. Jun 2009;32(6):359-363.
258. Baker J, Ajani J, Scotte F, et al. Docetaxel-related side effects and their management. *Eur J Oncol Nurs*. Feb 2009;13(1):49-59.

259. Kulke MH, Tempero MA, Niedzwiecki D, et al. Randomized phase II study of gemcitabine administered at a fixed dose rate or in combination with cisplatin, docetaxel, or irinotecan in patients with metastatic pancreatic cancer: CALGB 89904. *J Clin Oncol*. Nov 20 2009;27(33):5506-5512.
260. Lopes G, Rocha Lima CM. Docetaxel in the management of advanced pancreatic cancer. *Semin Oncol*. Apr 2005;32(2 Suppl 4):S10-23.
261. Carvajal RD, Tse A, Shah MA, et al. A phase II study of flavopiridol (Alvocidib) in combination with docetaxel in refractory, metastatic pancreatic cancer. *Pancreatol*. 2009;9(4):404-409.
262. Cowan KH, Moscow JA, Huang H, et al. Paclitaxel chemotherapy after autologous stem-cell transplantation and engraftment of hematopoietic cells transduced with a retrovirus containing the multidrug resistance complementary DNA (MDR1) in metastatic breast cancer patients. *Clin Cancer Res*. Jul 1999;5(7):1619-1628.
263. Devereux S, Corney C, Macdonald C, et al. Feasibility of multidrug resistance (MDR-1) gene transfer in patients undergoing high-dose therapy and peripheral blood stem cell transplantation for lymphoma. *Gene Ther*. Mar 1998;5(3):403-408.
264. Hesdorffer C, Ayello J, Ward M, et al. Phase I trial of retroviral-mediated transfer of the human MDR1 gene as marrow chemoprotection in patients undergoing high-dose chemotherapy and autologous stem-cell transplantation. *J Clin Oncol*. Jan 1998;16(1):165-172.
265. Rahman Z, Kavanagh J, Champlin R, et al. Chemotherapy immediately following autologous stem-cell transplantation in patients with advanced breast cancer. *Clin Cancer Res*. Nov 1998;4(11):2717-2721.
266. Modlich U, Kustikova OS, Schmidt M, et al. Leukemias following retroviral transfer of multidrug resistance 1 (MDR1) are driven by combinatorial insertional mutagenesis. *Blood*. Jun 1 2005;105(11):4235-4246.
267. Unger MM, Wahl J, Ushmorov A, et al. Enriching suicide gene bearing tumor cells for an increased bystander effect. *Cancer Gene Ther*. Jan 2007;14(1):30-38.
268. Papapetrou EP, Ziros PG, Micheva ID, Zoumbos NC, Athanassiadou A. Gene transfer into human hematopoietic progenitor cells with an episomal vector carrying an S/MAR element. *Gene Ther*. Jan 2006;13(1):40-51.
269. Jenke AC, Eisenberger T, Baiker A, Stehle IM, Wirth S, Lipps HJ. The nonviral episomal replicating vector pEPI-1 allows long-term inhibition of bcr-abl expression by shRNA. *Hum Gene Ther*. Apr 2005;16(4):533-539.
270. Jenke AC, Wilhelm AD, Orth V, Lipps HJ, Protzer U, Wirth S. Long-term suppression of hepatitis B virus replication by short hairpin RNA expression using the scaffold/matrix attachment region-based replicating vector system pEPI-1. *Antimicrob Agents Chemother*. Jul 2008;52(7):2355-2359.
271. Schaarschmidt D, Baltin J, Stehle IM, Lipps HJ, Knippers R. An episomal mammalian replicon: sequence-independent binding of the origin recognition complex. *Embo J*. Jan 14 2004;23(1):191-201.
272. Tahara I, Miyake K, Hanawa H, et al. Systemic cancer gene therapy using adeno-associated virus type 1 vector expressing MDA-7/IL24. *Mol Ther*. Oct 2007;15(10):1805-1811.
273. Streck CJ, Dickson PV, Ng CY, et al. Adeno-associated virus vector-mediated systemic delivery of IFN-beta combined with low-dose cyclophosphamide affects tumor regression in murine neuroblastoma models. *Clin Cancer Res*. Aug 15 2005;11(16):6020-6029.
274. Tandle A, Hanna E, Lorang D, et al. Tumor vasculature-targeted delivery of tumor necrosis factor-alpha. *Cancer*. Jan 1 2009;115(1):128-139.

275. Kanazawa T, Mizukami H, Nishino H, et al. Topoisomerase inhibitors enhance the cytotoxic effect of AAV-HSVtk/ganciclovir on head and neck cancer cells. *Int J Oncol.* Sep 2004;25(3):729-735.
276. Chen Q, Li ZB, Zeng ZJ, Luo SQ, Hu WX. [The construction of recombinant AAV vector expressing HSVtk gene controlled by Tet-On and the detection of its activity]. *Sheng Wu Gong Cheng Xue Bao.* May 2005;21(3):360-364.
277. Li ZB, Zeng ZJ, Chen Q, Luo SQ, Hu WX. Recombinant AAV-mediated HSVtk gene transfer with direct intratumoral injections and Tet-On regulation for implanted human breast cancer. *BMC Cancer.* 2006;6:66.
278. Liu L, Liu H, Visner G, Fletcher BS. Sleeping Beauty-mediated eNOS gene therapy attenuates monocrotaline-induced pulmonary hypertension in rats. *Faseb J.* Dec 2006;20(14):2594-2596.
279. Ohlfest JR, Frandsen JL, Fritz S, et al. Phenotypic correction and long-term expression of factor VIII in hemophilic mice by immunotolerization and nonviral gene transfer using the Sleeping Beauty transposon system. *Blood.* Apr 1 2005;105(7):2691-2698.
280. Yant SR, Wu X, Huang Y, Garrison B, Burgess SM, Kay MA. High-resolution genome-wide mapping of transposon integration in mammals. *Mol Cell Biol.* Mar 2005;25(6):2085-2094.
281. Vigdal TJ, Kaufman CD, Izsvak Z, Voytas DF, Ivics Z. Common physical properties of DNA affecting target site selection of sleeping beauty and other Tc1/mariner transposable elements. *J Mol Biol.* Oct 25 2002;323(3):441-452.
282. Groth AC, Olivares EC, Thyagarajan B, Calos MP. A phage integrase directs efficient site-specific integration in human cells. *Proc Natl Acad Sci U S A.* May 23 2000;97(11):5995-6000.
283. Olivares EC, Hollis RP, Chalberg TW, Meuse L, Kay MA, Calos MP. Site-specific genomic integration produces therapeutic Factor IX levels in mice. *Nat Biotechnol.* Nov 2002;20(11):1124-1128.
284. Waehler R, Russell SJ, Curiel DT. Engineering targeted viral vectors for gene therapy. *Nat Rev Genet.* Aug 2007;8(8):573-587.
285. Yant SR, Ehrhardt A, Mikkelsen JG, Meuse L, Pham T, Kay MA. Transposition from a gutless adeno-transposon vector stabilizes transgene expression in vivo. *Nat Biotechnol.* Oct 2002;20(10):999-1005.
286. Loo TW, Clarke DM. Functional consequences of glycine mutations in the predicted cytoplasmic loops of P-glycoprotein. *J Biol Chem.* Mar 11 1994;269(10):7243-7248.
287. Capiiaux GM, Budak-Alpdogan T, Takebe N, et al. Retroviral transduction of a mutant dihydrofolate reductase-thymidylate synthase fusion gene into murine marrow cells confers resistance to both methotrexate and 5-fluorouracil. *Hum Gene Ther.* Mar 20 2003;14(5):435-446.
288. Choi CH. ABC transporters as multidrug resistance mechanisms and the development of chemosensitizers for their reversal. *Cancer Cell Int.* Oct 4 2005;5:30.
289. Cottin S, Ghani K, Caruso M. Bystander effect in glioblastoma cells with a predominant cytoplasmic localization of connexin43. *Cancer Gene Ther.* Dec 2008;15(12):823-831.
290. Schaller BJ, Cornelius JF, Sandu N, Buchfelder M. Molecular imaging of brain tumors personal experience and review of the literature. *Curr Mol Med.* Dec 2008;8(8):711-726.
291. Fontanellas A, Hervas-Stubbs S, Sampredo A, et al. PET imaging of thymidine kinase gene expression in the liver of non-human primates following systemic delivery of an adenoviral vector. *Gene Ther.* Jan 2009;16(1):136-141.
292. Gade TP, Koutcher JA, Spees WM, et al. Imaging transgene activity in vivo. *Cancer Res.* Apr 15 2008;68(8):2878-2884.

293. Garin MI, Garrett E, Tiberghien P, et al. Molecular mechanism for ganciclovir resistance in human T lymphocytes transduced with retroviral vectors carrying the herpes simplex virus thymidine kinase gene. *Blood*. Jan 1 2001;97(1):122-129.
294. Kuriyama S, Sakamoto T, Kikukawa M, et al. Expression of a retrovirally transduced gene under control of an internal housekeeping gene promoter does not persist due to methylation and is restored partially by 5-azacytidine treatment. *Gene Ther*. Oct 1998;5(10):1299-1305.
295. Hamel W, Magnelli L, Chiarugi VP, Israel MA. Herpes simplex virus thymidine kinase/ganciclovir-mediated apoptotic death of bystander cells. *Cancer Res*. Jun 15 1996;56(12):2697-2702.
296. Adachi M, Sampath J, Lan LB, et al. Expression of MRP4 confers resistance to ganciclovir and compromises bystander cell killing. *J Biol Chem*. Oct 11 2002;277(41):38998-39004.
297. Ziller C, Lincet H, Muller CD, Staedel C, Behr JP, Poulain L. The cyclin-dependent kinase inhibitor p21(cip1/waf1) enhances the cytotoxicity of ganciclovir in HSV-tk transfected ovarian carcinoma cells. *Cancer Lett*. Aug 20 2004;212(1):43-52.
298. van Dillen IJ, Mulder NH, Sluiter WJ, et al. Influence of p53 status on the HSV-Tk/GCV-induced bystander effect in a panel of human ovarian carcinoma cell lines. *Oncol Res*. 2005;15(3):151-159.
299. Shiau AL, Yang HM, Wu P, Wu CL. Provision of positive and negative selections in retroviral vectors containing the cytosine deaminase gene. *Gene Ther*. Nov 1998;5(11):1571-1574.
300. Wei K, Huber BE. Cytosine deaminase gene as a positive selection marker. *J Biol Chem*. Feb 16 1996;271(7):3812-3816.
301. Karmali MA. Infection by verocytotoxin-producing *Escherichia coli*. *Clin Microbiol Rev*. Jan 1989;2(1):15-38.
302. Lala P, Ito S, Lingwood CA. Retroviral transfection of Madin-Darby canine kidney cells with human MDR1 results in a major increase in globotriaosylceramide and 10(5)- to 10(6)-fold increased cell sensitivity to verocytotoxin. Role of p-glycoprotein in glycolipid synthesis. *J Biol Chem*. Mar 3 2000;275(9):6246-6251.
303. Arab S, Rutka J, Lingwood C. Verotoxin induces apoptosis and the complete, rapid, long-term elimination of human astrocytoma xenografts in nude mice. *Oncol Res*. 1999;11(1):33-39.
304. Mizuguchi H, Xu Z, Ishii-Watabe A, Uchida E, Hayakawa T. IRES-dependent second gene expression is significantly lower than cap-dependent first gene expression in a bicistronic vector. *Mol Ther*. Apr 2000;1(4):376-382.
305. Yu X, Zhan X, D'Costa J, et al. Lentiviral vectors with two independent internal promoters transfer high-level expression of multiple transgenes to human hematopoietic stem-progenitor cells. *Mol Ther*. Jun 2003;7(6):827-838.
306. Yang X, Chen Z, Wang W. [A retroviral bicistronic strategy for efficient coexpression of ALDH1 and mdr1]. *Zhonghua Xue Ye Xue Za Zhi*. Dec 2001;22(12):625-628.
307. Pfutzner W. Retroviral bicistronic vectors. *Drug News Perspect*. Nov 2008;21(9):473-480.
308. Kim JH, Lee YS, Kim H, Huang JH, Yoon AR, Yun CO. Relaxin expression from tumor-targeting adenoviruses and its intratumoral spread, apoptosis induction, and efficacy. *J Natl Cancer Inst*. Oct 18 2006;98(20):1482-1493.
309. Merten OW. State-of-the-art of the production of retroviral vectors. *J Gene Med*. Feb 2004;6 Suppl 1:S105-124.
310. Pfirschke C, Schirmacher V. Cross-infection of tumor cells by contact with T lymphocytes loaded with Newcastle disease virus. *Int J Oncol*. Apr 2009;34(4):951-962.
311. Cole C, Qiao J, Kottke T, et al. Tumor-targeted, systemic delivery of therapeutic viral vectors using hitchhiking on antigen-specific T cells. *Nat Med*. Oct 2005;11(10):1073-1081.

312. Ong HT, Hasegawa K, Dietz AB, Russell SJ, Peng KW. Evaluation of T cells as carriers for systemic measles virotherapy in the presence of antiviral antibodies. *Gene Ther.* Feb 2007;14(4):324-333.
313. Ilett EJ, Prestwich RJ, Kottke T, et al. Dendritic cells and T cells deliver oncolytic reovirus for tumour killing despite pre-existing anti-viral immunity. *Gene Ther.* May 2009;16(5):689-699.
314. Smith-Franklin BA, Keele BF, Tew JG, et al. Follicular dendritic cells and the persistence of HIV infectivity: the role of antibodies and Fcgamma receptors. *J Immunol.* Mar 1 2002;168(5):2408-2414.
315. Griffiths L, Binley K, Iqbal S, et al. The macrophage - a novel system to deliver gene therapy to pathological hypoxia. *Gene Ther.* Feb 2000;7(3):255-262.
316. Garcia-Castro J, Martinez-Palacio J, Lillo R, et al. Tumor cells as cellular vehicles to deliver gene therapies to metastatic tumors. *Cancer Gene Ther.* Apr 2005;12(4):341-349.
317. Power AT, Wang J, Falls TJ, et al. Carrier cell-based delivery of an oncolytic virus circumvents antiviral immunity. *Mol Ther.* Jan 2007;15(1):123-130.
318. Raykov Z, Balboni G, Aprahamian M, Rommelaere J. Carrier cell-mediated delivery of oncolytic parvoviruses for targeting metastases. *Int J Cancer.* May 1 2004;109(5):742-749.
319. Hamada K, Desaki J, Nakagawa K, et al. Carrier cell-mediated delivery of a replication-competent adenovirus for cancer gene therapy. *Mol Ther.* Jun 2007;15(6):1121-1128.
320. Hall B, Andreeff M, Marini F. The participation of mesenchymal stem cells in tumor stroma formation and their application as targeted-gene delivery vehicles. *Handb Exp Pharmacol.* 2007(180):263-283.
321. Mishra PJ, Mishra PJ, Glod JW, Banerjee D. Mesenchymal stem cells: flip side of the coin. *Cancer Res.* Feb 15 2009;69(4):1255-1258.
322. Karnoub AE, Dash AB, Vo AP, et al. Mesenchymal stem cells within tumour stroma promote breast cancer metastasis. *Nature.* Oct 4 2007;449(7162):557-563.
323. Aboody KS, Najbauer J, Danks MK. Stem and progenitor cell-mediated tumor selective gene therapy. *Gene Ther.* May 2008;15(10):739-752.
324. Ren C, Kumar S, Chanda D, et al. Cancer gene therapy using mesenchymal stem cells expressing interferon-beta in a mouse prostate cancer lung metastasis model. *Gene Ther.* Nov 2008;15(21):1446-1453.
325. Debatin KM, Wei J, Beltinger C. Endothelial progenitor cells for cancer gene therapy. *Gene Ther.* May 2008;15(10):780-786.
326. Germano IM, Uzzaman M, Keller G. Gene delivery by embryonic stem cells for malignant glioma therapy: hype or hope? *Cancer Biol Ther.* Sep 2008;7(9):1341-1347.
327. Shimato S, Natsume A, Takeuchi H, et al. Human neural stem cells target and deliver therapeutic gene to experimental leptomeningeal medulloblastoma. *Gene Ther.* Aug 2007;14(15):1132-1142.
328. Ulrich AS. Biophysical aspects of using liposomes as delivery vehicles. *Biosci Rep.* Apr 2002;22(2):129-150.
329. Bharali DJ, Klejbor I, Stachowiak EK, et al. Organically modified silica nanoparticles: a nonviral vector for in vivo gene delivery and expression in the brain. *Proc Natl Acad Sci U S A.* Aug 9 2005;102(32):11539-11544.
330. Hung SC, Deng WP, Yang WK, et al. Mesenchymal stem cell targeting of microscopic tumors and tumor stroma development monitored by noninvasive in vivo positron emission tomography imaging. *Clin Cancer Res.* Nov 1 2005;11(21):7749-7756.
331. Brown GM, Brown DM, Donaldson K, Drost E, MacNee W. Neutrophil sequestration in rat lungs. *Thorax.* Jun 1995;50(6):661-667.
332. Wei J, Blum S, Unger M, et al. Embryonic endothelial progenitor cells armed with a suicide gene target hypoxic lung metastases after intravenous delivery. *Cancer Cell.* May 2004;5(5):477-488.

333. Li J, Law HK, Lau YL, Chan GC. Differential damage and recovery of human mesenchymal stem cells after exposure to chemotherapeutic agents. *Br J Haematol*. Nov 2004;127(3):326-334.
334. Mueller LP, Luetzkendorf J, Mueller T, Reichelt K, Simon H, Schmoll HJ. Presence of mesenchymal stem cells in human bone marrow after exposure to chemotherapy: evidence of resistance to apoptosis induction. *Stem Cells*. Dec 2006;24(12):2753-2765.
335. Bunting KD. ABC transporters as phenotypic markers and functional regulators of stem cells. *Stem Cells*. 2002;20(1):11-20.
336. Vilalta M, Degano IR, Bago J, et al. Human adipose tissue-derived mesenchymal stromal cells as vehicles for tumor bystander effect: a model based on bioluminescence imaging. *Gene Ther*. Apr 2009;16(4):547-557.
337. Matuskova M, Hlubinova K, Pastorakova A, et al. HSV-tk expressing mesenchymal stem cells exert bystander effect on human glioblastoma cells. *Cancer Lett*. Sep 16 2009.
338. Guichard SM, Morton CL, Krull EJ, Stewart CF, Danks MK, Potter PM. Conversion of the CPT-11 metabolite APC to SN-38 by rabbit liver carboxylesterase. *Clin Cancer Res*. Dec 1998;4(12):3089-3094.
339. Danks MK, Yoon KJ, Bush RA, et al. Tumor-targeted enzyme/prodrug therapy mediates long-term disease-free survival of mice bearing disseminated neuroblastoma. *Cancer Res*. Jan 1 2007;67(1):22-25.
340. Zhu W, Xu W, Jiang R, et al. Mesenchymal stem cells derived from bone marrow favor tumor cell growth in vivo. *Exp Mol Pathol*. Jun 2006;80(3):267-274.
341. Yu JM, Jun ES, Bae YC, Jung JS. Mesenchymal stem cells derived from human adipose tissues favor tumor cell growth in vivo. *Stem Cells Dev*. Jun 2008;17(3):463-473.
342. Djouad F, Ponce P, Bony C, et al. Immunosuppressive effect of mesenchymal stem cells favors tumor growth in allogeneic animals. *Blood*. Nov 15 2003;102(10):3837-3844.
343. Ramasamy R, Lam EW, Soeiro I, Tisato V, Bonnet D, Dazzi F. Mesenchymal stem cells inhibit proliferation and apoptosis of tumor cells: impact on in vivo tumor growth. *Leukemia*. Feb 2007;21(2):304-310.
344. Ohlsson LB, Varas L, Kjellman C, Edvardsen K, Lindvall M. Mesenchymal progenitor cell-mediated inhibition of tumor growth in vivo and in vitro in gelatin matrix. *Exp Mol Pathol*. Dec 2003;75(3):248-255.
345. Khakoo AY, Pati S, Anderson SA, et al. Human mesenchymal stem cells exert potent antitumorigenic effects in a model of Kaposi's sarcoma. *J Exp Med*. May 15 2006;203(5):1235-1247.
346. Qiao L, Xu Z, Zhao T, et al. Suppression of tumorigenesis by human mesenchymal stem cells in a hepatoma model. *Cell Res*. Apr 2008;18(4):500-507.
347. Lee K, Majumdar MK, Buyaner D, Hendricks JK, Pittenger MF, Mosca JD. Human mesenchymal stem cells maintain transgene expression during expansion and differentiation. *Mol Ther*. Jun 2001;3(6):857-866.
348. Wagner W, Ho AD. Mesenchymal stem cell preparations--comparing apples and oranges. *Stem Cell Rev*. Dec 2007;3(4):239-248.
349. Snyder EY, Deitcher DL, Walsh C, Arnold-Aldea S, Hartwig EA, Cepko CL. Multipotent neural cell lines can engraft and participate in development of mouse cerebellum. *Cell*. Jan 10 1992;68(1):33-51.
350. Yeager TR, Reddel RR. Constructing immortalized human cell lines. *Curr Opin Biotechnol*. Oct 1999;10(5):465-469.
351. Cattaneo E, Conti L. Generation and characterization of embryonic striatal conditionally immortalized ST14A cells. *J Neurosci Res*. Jul 15 1998;53(2):223-234.
352. Bai Y, Hu Q, Li X, et al. Telomerase immortalization of human neural progenitor cells. *Neuroreport*. Feb 9 2004;15(2):245-249.

353. Natesan S. Telomerase extends a helping hand to progenitor cells. *Trends Biotechnol.* Jan 2005;23(1):1-3.
354. Zhang X, Soda Y, Takahashi K, et al. Successful immortalization of mesenchymal progenitor cells derived from human placenta and the differentiation abilities of immortalized cells. *Biochem Biophys Res Commun.* Dec 29 2006;351(4):853-859.
355. Cacci E, Villa A, Parmar M, et al. Generation of human cortical neurons from a new immortal fetal neural stem cell line. *Exp Cell Res.* Feb 1 2007;313(3):588-601.
356. De Filippis L, Lamorte G, Snyder EY, Malgaroli A, Vescovi AL. A novel, immortal, and multipotent human neural stem cell line generating functional neurons and oligodendrocytes. *Stem Cells.* Sep 2007;25(9):2312-2321.
357. Aboody KS, Brown A, Rainov NG, et al. Neural stem cells display extensive tropism for pathology in adult brain: evidence from intracranial gliomas. *Proc Natl Acad Sci U S A.* Nov 7 2000;97(23):12846-12851.
358. Takeuchi M, Takeuchi K, Kohara A, et al. Chromosomal instability in human mesenchymal stem cells immortalized with human papilloma virus E6, E7, and hTERT genes. *In Vitro Cell Dev Biol Anim.* Mar-Apr 2007;43(3-4):129-138.
359. Brown AB, Yang W, Schmidt NO, et al. Intravascular delivery of neural stem cell lines to target intracranial and extracranial tumors of neural and non-neural origin. *Hum Gene Ther.* Dec 10 2003;14(18):1777-1785.
360. Silva FH, Nardi NB. From leading role to the backstage: mesenchymal stem cells as packaging cell lines for in situ production of viral vectors. *Med Hypotheses.* 2006;67(4):922-925.
361. Uchibori R, Okada T, Ito T, et al. Retroviral vector-producing mesenchymal stem cells for targeted suicide cancer gene therapy. *J Gene Med.* May 2009;11(5):373-381.
362. Josiah DT, Zhu D, Dreher F, Olson J, McFadden G, Caldas H. Adipose-derived stem cells as therapeutic delivery vehicles of an oncolytic virus for glioblastoma. *Mol Ther.* Feb;18(2):377-385.
363. Sugimoto Y, Sato S, Tsukahara S, et al. Coexpression of a multidrug resistance gene (MDR1) and herpes simplex virus thymidine kinase gene in a bicistronic retroviral vector Ha-MDR-IRES-TK allows selective killing of MDR1-transduced human tumors transplanted in nude mice. *Cancer Gene Ther.* Jan-Feb 1997;4(1):51-58.
364. Feroni C, Galli R, Cipelletti B, et al. Resilience to transformation and inherent genetic and functional stability of adult neural stem cells ex vivo. *Cancer Res.* Apr 15 2007;67(8):3725-3733.
365. Carmichael J, DeGraff WG, Gazdar AF, Minna JD, Mitchell JB. Evaluation of a tetrazolium-based semiautomated colorimetric assay: assessment of radiosensitivity. *Cancer Res.* Feb 15 1987;47(4):943-946.

*ANEXO I: MATERIALES Y
MÉTODOS*

1. TÉCNICAS DE BIOLOGÍA MOLECULAR

1.1. Plásmidos retrovirales utilizados

1.1.1. Plásmido pRV_GFPiresMDR

El plásmido pRV_GFPiresMDR fue cedido por el Dr. Jonathan Vogel (NCI, National Institutes of Health, Bethesda, MD, USA). Esta construcción contiene el gen de la proteína verde fluorescente (GFP), bajo el promotor del citomegalovirus (CMV), unido al gen de la MDR1 mediante una secuencia IRES (*Internal ribosomal entry sites*), en la estructura del retrovirus Harvei. Esta secuencia IRES permite la transducción independiente de las dos proteínas a partir de un ARN mensajero común, lo que asegura la expresión de ambos genes en la célula diana.

1.1.2. Plásmido pRV_FCU

El plásmido pRV_FCU fue cedido por el Dr. Vladimir Ponomarev (Department of Radiology, Memorial Sloan-Kettering Cancer Center, New York, USA). Esta construcción contiene el gen FCU, formado por la fusión del gen de la Citosina Deaminasa de *Saccharomyces cerevisiae* (yCDA) con el gen de la Uracil fosforibosiltransferasa de la *Haemophilus influenzae* (iUPP), bajo el control de la secuencia LTR (*viral Long Terminal Repeats*) del virus. Este gen FCU está unido a un gen de resistencia a neomicina mediante una secuencia IRES derivada del virus de la encefalomiocarditis, lo que permite seleccionar las células que incorporan el plásmido retroviral mediante tratamiento con genitocina.

Ambos plásmidos contienen un gen de resistencia a ampicilina (*E.Coli Amp^r*), que permite la propagación y la selección de las bacterias que han incorporado la construcción.

Para amplificar estos plásmidos se necesitaron ciertas técnicas de biología molecular.

1.2. Transformación en bacterias competentes

Para obtener las cantidades necesarias de los distintos plásmidos de ADN usados en el presente estudio, se ha realizado un proceso de amplificación de los mismos mediante la generación de bacterias competentes DH5 α y su transformación (incorporación de ADN en bacterias). Para facilitar dicha transformación, se ha utilizado la técnica de la electroporación, que consiste en la aplicación de una corriente eléctrica que produce poros en la membrana de las bacterias y permite la entrada del ADN exógeno. Para ello, las alícuotas de bacterias

competentes (50 μ l/alícuota) fueron descongeladas en hielo y se les añadió de 10-25ng de ADN plasmídico, en un volumen final de 2 μ l. Esta mezcla fue incubada en hielo durante 5 minutos y introducida en cubetas de electroporación, previamente refrigeradas en hielo. A continuación, se transmitió un impulso eléctrico mediante el uso de un electroporador (Electro Cell Manipulator™ ECM 630), con las siguientes condiciones: 50 μ F, 1500 V y 125 Ω . La electroporación se dió por buena cuando el pulso de corriente era superior a 5 mseg. Acto seguido, las células se resuspendían en 500 μ l de pf (1% Triptona, 0.5% de extracto de levadura y 0.5% NaCl) y se incubaba durante 1h en agitación a 37°C para permitir que las bacterias expresasen la resistencia del plásmido transferido. Finalmente, se sembraron 20 μ l de bacterias en una placa de LB con el antibiótico de selección adecuado.

1.3. Amplificación de ADN

Una vez expandidas las colonias con el plásmido de interés, éste fue extraído mediante un kit comercial de Invitrogen “PureLink™ HiPure Plasmid Filter Purification Kits”, basado en la lisis alcalina con SDS de las membranas bacterianas. Posteriormente, el plásmido resultante se cuantificó y se analizó mediante digestión enzimática, para comprobar la integridad y calidad del mismo. Una vez confirmado que el plásmido era correcto se amplificó mediante el kit nombrado anteriormente y se utilizó para transfectar los cultivos celulares.

2. TÉCNICAS DE BIOLOGÍA CELULAR

2.1. Líneas celulares utilizadas

2.1.1. NP18

La línea celular tumoral NP18 se estableció en el Servicio de Digestivo del Hospital de Sant Pablo de Barcelona y fue cedida por el Laboratorio de Investigación Gastrointestinal del mismo hospital. Esta línea tumoral derivaba de un adenocarcinoma pancreático humano implantado en el páncreas de ratones atímicos y perpetuado como xenoimplantes en sucesivos ratones. Estas células se mantuvieron en cultivo en DMEM (*Dulbecco's Modification of Eagle's Medium* Gibco BRL) complementado con un 5% de FBS (*Fetal Bovine Serum*, Gibco BRL), previamente inactivado en un baño a 56°C durante 30 minutos. Al medio de cultivo también se le ha añadido una mezcla de antibióticos penicilina (100U/ml) i estreptomina (100µg/ml) en una proporción 1:100 (1% de P/S, Gibco BRL).

2.1.2. mMSC

Las células madre mesenquimales de ratón (mMSC) se obtuvieron de hembras Balb-C atímicas de 6 meses de edad. El tejido adiposo que recubre la bufeta fue extraído y lavado con PBS (*Phosphate Buffer Saline*). Seguidamente, este tejido fue digerido mecánicamente y por incubación con colagenasa a una concentración final de 0.075% (diluyendo 105mg de colagenasa en 20ml de PBS, filtrándola posteriormente con un filtro de 0.22mm y mezclándola con 20ml de grasa disgregada), durante 1h a 37°C en agitación. Después de inactivar la colagenasa con el mismo volumen de medio al 5% de FBS (40ml), se filtró todo el contenido, utilizando un filtro de 70µm, y se centrifugó a 1.200g durante 10 minutos. Se eliminó el sobrenadante y se lavó el pellet de células tres veces con PBS. Posteriormente, se contaron las células (2.4×10^6 células totales) y se sembraron en una placa de 10cm de diámetro con α MEM suplementado con 15% de FBS y con 1% de P/S. El medio fue cambiado cada día, hasta que el cultivo llegó a confluencia (5-8 días) y se procedió a su congelación según el apartado 2.3.

2.1.3. hMSC

Las Células Madre Mesenquimales humanas (hMSC) fueron extraídas a partir de la médula ósea de donantes sanos en el Hospital Universitario Niño Jesús y cedidas amablemente por el Dr. García-Castro (Servicio de Oncohematología y Trasplante, Hospital Universitario Niño Jesús,

Madrid, España). Estas células se mantuvieron en cultivo en DMEM al 10% de FBS y 1% de P/S y se congelaron en nitrógeno líquido.

2.1.4. rFLMSC

Las Células Madre Mesenquimales Fetales (rFLMSC) fueron extraídas a partir de hígados fetales de conejo y cedidas generosamente por el Dr. Josep María Aran (Institut d'Investigacions Biomèdiques de Bellvitge (IDIBELL), Barcelona, España). Estas células se crecieron en α MEM al 15% de FBS y 1% de P/S y se procedió a su congelación.

2.1.5. PA317DsGFP

La línea celular empaquetadora PA317GFP fue cedida por el Dr. Fernando Larcher (Centro de Investigaciones Energéticas, Medioambientales y Tecnológicas, CIEMAT, Madrid, España) y se creció en DMEM al 10% de FBS y 1% de P/S.

Esta línea se generó a partir de una transfección estable de un plásmido retroviral que expresaba la proteína verde fluorescente (GFP). De esta forma, dicha línea permite la producción estable de vectores retrovirales que expresan la proteína GFP.

2.1.6. HEK 293 Phoenix anfotróficas

La línea celular empaquetadora 293 Phoenix anfotróficas se obtuvo a partir de la ATCC (*American Type Cell Culture*) y fue cultivada en DMEM al 10% de FBS y 1% de P/S. Cada cierto tiempo (1-2 semanas), se aconseja tratar estas células con Higromicina (300 μ g/ml) y con Toxina Diftérica (1 μ g/ml) para asegurar la expresión estable de los dos plásmidos retrovirales.

Esta línea se utilizó para la producción transitoria de los retrovirus empleados en esta tesis.

Todas las líneas utilizadas en la presente tesis se mantuvieron a 37°C y a una concentración de 5% de CO₂ en una atmósfera húmeda y fueron testadas periódicamente para micoplasma.

2.2. Recuento celular

Para determinar el número de células en cultivo y poder sembrar una cantidad concreta, las células se tripsinizaron (Tripsina-EDTA de Gibco BRL) y se resuspendieron en DMEM al 5% FBS. De esta suspensión celular, se obtuvo una alícuota, se diluyó con azul tripán y se cargó en una cámara de Neubauer o hemocitómetro. El colorante azul tripán se internaliza únicamente en

las células muertas, lo que nos permitió estimar la viabilidad del cultivo. Para calcular el número de células de la solución celular se contó el número de células presentes en 4 de los 8 cuadrantes de la cámara de Neubauer y se aplicó la siguiente fórmula.

$$\text{N}^\circ \text{ de células/ml} = \text{Media del número de células viables por cuadrante} \times \text{dilución} \times 10^4$$

Finalmente, la suspensión celular se diluyó hasta la concentración necesaria para el experimento.

2.3. Congelación y descongelación de las líneas celulares

Para congelar una línea celular, se tripsinizaron las células, se centrifugaron y se resuspendieron en un medio de criopreservación que contiene un 90% de FBS inactivado y un 10% de agente crioprotector DMSO (Dimetilsulfóxido, Sigma). Las células de una placa de 15cm confluyente se resuspendieron en 5ml de medio de congelación y se distribuyeron en 5 criotubos (1ml/vial). Estos viales se congelaron en un tanque que contenía isopropanol y que permitía la disminución progresiva de la temperatura, y se mantuvieron en un congelador de -80°C. Cuando estas alícuotas estuvieron completamente congeladas (6h) se pasaron a un tanque de nitrógeno líquido donde se almacenaron durante largos períodos de tiempo.

Por otro lado, la descongelación de las líneas celulares se realizó de forma rápida en un baño a 37°C. Una vez se descongeló la alícuota, la suspensión celular se pasó a un tubo de 15ml tipo falcon y se centrifugó durante 5 minutos a 1250 rpm. El sobrenadante se aspiró y el pellet de células se resuspendió, en el medio correspondiente para cada línea celular, y se sembró en una placa de 10cm de diámetro. A las 12h, la mayor parte de las células estaban adheridas a la placa y se volvió a cambiar el medio, para eliminar las células muertas.

En algunos tipos celulares más sensibles a la descongelación, como las 293 Phoenix o las PA317GFP, una vez descongelada la alícuota, la suspensión celular se sembró directamente en una placa de 10cm de diámetro, sin centrifugación previa. Para diluir la cantidad de DMSO se aumentó el volumen de la placa hasta 25ml y a las 12h se le reemplazó el medio.

2.4. Control de micoplasma

La contaminación de las líneas celulares con micoplasma es bastante frecuente y pasa visualmente desapercibida en los cultivos. A pesar de ello, esta contaminación puede afectar los resultados experimentales y, por este motivo, se aconseja realizar tests rutinarios de micoplasma de todas las líneas celulares en cultivo.

Este test se basa en la detección del microorganismo por PCR a partir de las secuencias MICO-1 y MICO-2 (Tabla 1)

Secuencia de aminoácidos	
MICO-1	5'- GGCGAATGGGTGAGTAACACG-3'
MICO-2	5'-CGGATAACGCTTGCGACTATG-3'

Tabla 1. Secuencia aminoacídica de los cebadores utilizados para la detección del micoplasma.

Para testar las células utilizadas en el presente trabajo, éstas se sembraron en ausencia de antibióticos y se mantuvieron en cultivo hasta que llegaron a confluencia. Al cabo de 5 días, se obtuvo una muestra del medio de las células y se realizó la PCR. Todas las líneas utilizadas en esta tesis presentaron un resultado de micoplasma negativo.

En el caso que esta PCR hubiese dado positiva, se hubiese considerado que la línea celular estaba infectada y se hubiese procedido a la desmicoplasmatización de las células. El tratamiento se basa en el mantenimiento de las células con plasmocina (Plasmocin TM) durante 14 días.

2.5. Agentes químicos utilizados

2.5.1. Docetaxel (TAXOTERE)

El docetaxel se obtuvo de la empresa Sanofi Aventis. A partir de la solución madre se preparó una solución estoc de 10mg/ml en un tampón de polisorbato según el protocolo de manufacturación y se guardó a 4°C. Las soluciones de trabajo se prepararon en PBS en el momento de su uso.

2.5.2. Ganciclovir

El Ganciclovir (GCV) se obtuvo de la empresa Roche Diagnostics. A partir del compuesto sólido se preparó una solución estoc de 100mg/ml en PBS y de ésta se prepararon las soluciones de trabajo mediante diluciones en PBS o en medio de cultivo. Todas las soluciones de GCV se almacenaron en un congelador a -20°C.

2.5.3. 5-Fluorocitosina

La 5-Fluorocitosina (5-FC) se obtuvo de la empresa Sigma. A partir del compuesto sólido se preparó una solución estoc de 12.5mg/ml en PBS y se guardó a -20°C. La dilución de este compuesto en PBS no permite concentraciones superiores a 12.5mg/ml. Para conseguir concentraciones más elevadas es necesario calentar la solución a 60°C. Para los experimento *in*

vitro, se prepararon soluciones de trabajo mediante la dilución en PBS o en medio de cultivo de la solución estoc, y se almacenaron a -20°C.

2.6. Producción de retrovirus a partir de la línea empaquetadora PA317GFP

La línea empaquetadora PA317DsGFP se creció en DMEM al 10% de FBS hasta que llegó a una confluencia del 70-80%. Para concentrar el virus producido por las células empaquetadoras, se cultivaron en 4ml (placas de 10cm de diámetro) o en 1ml (pozos de 6) durante 12-16h. El medio condicionado de las células empaquetadoras se mezcló con un volumen del medio requerido por las células diana y se utilizó para infectar el cultivo celular (4ml totales de medio/placa de 10cm de diámetro), en presencia de 8µg/ml de polibreno y DMEM 10% FBS. Al día siguiente, las células infectadas se lavaron varias veces con PBS para eliminar el virus remanente, se les añadió medio fresco y se mantuvieron en cultivo hasta que llegaron a confluencia.

El medio condicionado de las células empaquetadoras puede ser congelado a -80°, pero esto hace que se reduzca considerablemente el título funcional.

El virus producido puede ser titulado mediante diluciones seriadas en las células NIH3T3. Aún así, en nuestros experimentos de infección utilizamos el medio condicionado de las PA317GFP sin titular.

2.7. Producción de retrovirus a partir de la línea 293 Phoenix anfotrófica

Para generar retrovirus en la línea 293 Phoenix anfotrófica, estas células fueron sembradas en placas de 10cm de diámetro. Cuando alcanzaron una confluencia del 70% (18-24h postsiembra) se transfectaron con los plásmidos retrovirales de interés, utilizando el método de transfección con $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$. Este método se basa en la formación de coprecipitados de fosfato calcico y ADN exógeno sobre la célula eucariota, favoreciendo así la entrada del ADN plasmídico. La adición de cloroquina (25µM concentración final), 5 minutos antes de la transfección, mejora la eficiencia de la técnica, al inhibir las DNAasas lisosomales.

La transfección de las 293 Phoenix consiste en:

- Mezclar 15µg de plásmido retroviral y 61µl 2M de CaCl_2 en un falcon de 15ml y llevarlo a un volumen final de 500µl con agua estéril.
- Añadir en un nuevo tubo de 15ml 0.5ml de 2xHBSS (véase fórmula a continuación) a pH=7.06 e ir añadiendo la solución de ADN (0.5ml), gota a gota, mientras se van generando burbujas de forma continua con un pipeteador automático.

- Añadir la solución de HBSS/ADN en una esquina de la placa de células 293 Phoenix, evitando levantar la monocapa.
- Incubar las células toda la noche a 37°C.

Al día siguiente se retiró el medio (la cloroquina es tóxica para las células si se mantiene más de 24h), se añadió, con mucho cuidado, 4 ml de medio fresco (DMEM al 5%) y las células fueron incubadas durante 16-24h. El sobrenadante de las 293 Phoenix transfectadas fue recogido y filtrado por un filtro de 0.45µm. Finalmente, este sobrenadante fue mezclado con un volumen de medio fresco, específico de la línea celular diana, y se utilizó para infectar las células diana (4ml/placa de 10cm de diámetro), en presencia de 8µg/ml de polibreno. Dichas células habían sido sembradas, previamente, a una confluencia del 70% para garantizar una óptima infección. Una vez infectadas, estas células se incubaron a 37°C toda la noche. Al día siguiente, se realizaron varios lavados con PBS, para eliminar el virus remanente, se añadió medio fresco al cultivo y se mantuvo a 37°C hasta que llegó a confluencia.

El HBSS utilizado para transfectar las 293 Phoenix se preparó de la siguiente manera:

<u>2XHBSS</u>	Concentración final	Solución estoc
Hepes	50mM	1M
KCl	10mM	1M
Dextrosa (D-Glucosa)	12mM	
NaCl	280nM	5M
Na ₂ HPO ₄ x2H ₂ O	1.5mM	75mM

Esta solución se preparó en H₂O destilada a un pH entre 6.9 y 7.1 y se filtra por un filtro de 0.22µm.

2.8. Generación de las líneas celulares modificadas mediante la infección con retrovirus

2.8.1. mMSC-GFP

Las células mMSC (pase 11) fueron incubadas durante dos días consecutivos con el sobrenadante de las PA317-GFP. La eficiencia de infección fue evaluada por microscopia de fluorescencia. Consideramos aceptable un cultivo con más de un 80% de células GFP positivas. Una vez conseguido dicho cultivo, las células fueron congeladas. Las mMSC-GFP que se utilizaron en los ensayos *in vitro* e *in vivo* estaban entre pase 13 y 15.

2.8.2. rFL-MSC-MDR-GFP

Las células rFL-MSC (pase 1) fueron infectadas durante dos días consecutivos con el sobrenadante de las 293 Phoenix transfectadas con el plásmido pRV_GFPiresMDR. A las 48h después de la primera infección, se empezó el tratamiento con 16ng/ml de docetaxel y, cuando el cultivo celular llegó a confluencia (5 días postratamiento) se determinó el porcentaje de células GFP positivas. Igual que en el caso anterior, la presencia de más de un 80% de células GFP positivas fue considerado aceptable y se procedió a la congelación del cultivo.

2.8.3. rFL-MSC-FCU

Las células rFL-MSC (pase 1) fueron infectadas durante dos días consecutivos con el sobrenadante de las 293 Phoenix transfectadas con el plásmido pRV_FCUI. A las 48h después de la primera infección, se empezó el tratamiento con 1.600µg/ml de geneticina y se mantuvieron en cultivo hasta que llegaron a confluencia (5 días postratamiento).

2.8.4. rFL-MSC-MDR/FCU-GFP

Las células rFL-MSC (pase 1) fueron infectadas durante dos días consecutivos con una mezcla de los sobrenadantes de las 293 Phoenix transfectadas con el plásmido pRV_GFPiresMDR o con el pRV_FCUI. A las 48h se trataron con 1.600µg/ml de geneticina y a las 96h se inició el tratamiento con 16ng/ml de docetaxel, manteniéndose el tratamiento con geneticina hasta que el cultivo llegó a confluencia (5 días después del inicio de tratamiento con geneticina).

Para garantizar una buena calidad de estas células, todas las rFL-MSC modificadas que se utilizaron en los ensayos *in vitro* e *in vivo* no sobrepasaron el pase 5.

2.9. Ensayo de diferenciación de las rFL-MSC modificadas con retrovirus

La caracterización funcional de las células madre se basa en la capacidad de diferenciarse a otros tipos celulares. Para determinar la capacidad de diferenciación de las rFL-MSC-MDR/TK-GFP a osteocitos y a adipositos, estas células fueron sembradas en placas de 6 pocillos y cultivadas con IMDM (*Iscove's Modification Dulbecco's Medium* Gibco BRL) al 15% de FBS y 1% de P/S, suplementado según el tipo de diferenciación (especificado a continuación). Como control de diferenciación se utilizaron las hMSC.

La composición del medio de diferenciación a osteoblastos es la siguiente:

Diferenciación Osteoblástica

	Concentración final	Solución estoc
Dexametasona	0.1µM	20µg/ml en DMEM (2% EtOH)
β-Glicerolfosfato	10mM	0.1g/ml en DMEM
Ascorbato-2-fosfato	0.2mM	1M en DMEM

El medio de diferenciación se cambió 3 veces por semana, durante 3 semanas. Después de este período, los osteocitos fueron marcados con rojo de Alizarina o *Alizarin Red*, que permite teñir los depósitos de calcio.

El procedimiento que se llevó a cabo fue el siguiente:

- Aspirar el medio de diferenciación de los pozos con cuidado de no despegar la monocapa
- Fijar el cultivo con EtOH al 70%, previamente enfriado a -20°C, durante 1h a temperatura ambiente
- Aspirar el alcohol y lavar (5-10 minutos) 2 veces con agua destilada
- Aspirar el agua y añadir 2ml de solución de *Alizarin Red* (véase fórmula a continuación)
- Incubar a temperatura ambiente durante 30 minutos
- Aspirar la solución y lavar 4 veces con agua destilada
- Añadir 2ml de agua para evitar que las células se sequen

Preparación de la solución de *Alizarin Red*

- Diluir 1gr de *Alizarin Red* en 50ml de agua destilada
- Mezclar la solución y ajustar el pH a 4.1-4.3 usando 0.5% de hidróxido de amonio
- El pH es crítico para esta solución. Por este motivo, es necesario preparar la solución fresca

La composición del medio de diferenciación a adipocitos es la siguiente:

Diferenciación Adipogénica

	Concentración final	Solución estoc
Isobutil-metil xantina (IBMX)	0.5mM	1M en DMSO
Hidrocortisona	1 μ M	50 μ g/ml en DMEM (5% EtOH)
Indometacina	0.1mM	50mg/ml en DMEM (5% EtOH)

El medio de diferenciación se cambio 3 veces por semana, durante 3 semanas. Después de este período, los adipocitos fueron marcados con aceite rojo o *Oil Red-O*, que es muy soluble en lípidos y permite teñir de rojo los acúmulos de grasa.

El procedimiento que se llevó a cabo fue el siguiente:

- Aspirar el medio de diferenciación y lavar con PBS con cuidado de no despegar la monocapa
- Fijar con paraformaldehído (PFA) al 4% (2ml/pozo de 6) durante 30-60 minutos a temperatura ambiente
- Lavar con agua esteril
- Añadir 2ml de isopropanol al 60% durante 2-5 minutos
- Aspirar el isopropanol, añadir 2ml de solución de trabajo *Oil Red-O* (véase fórmula a continuación) y dejar durante 5 minutos
- Lavar dos veces con isopropanol 60% durante 1 minuto
- Lavar con agua del grifo durante 5 minutos
- Teñir los núcleos con 2ml de hematoxilina durante 2-3 minutos
- Lavar con agua del grifo durante 3 minutos y cubrir los pozos con agua destilada para evitar que se sequen

Preparación de la solución de trabajo *Oil Red-O*

- Preparar una solución estoc a partir de 300mg de *Oil Red-O* en 100ml de isopropanol al 99%. Esta solución es estable durante un año
- Mezclar 3 volúmenes de la solución estoc de *Oil Red-O* con dos volúmenes de agua destilada y dejarlo durante 10 minutos a temperatura ambiente. Esta solución de trabajo sólo es estable durante 2h
- Filtrar la solución con un papel de filtro para descartar los grumos

Todos los reactivos utilizados en los ensayos de diferenciación de las MSC fueron suministrados por Sigma-Aldrich.

2.10. Ensayo de viabilidad celular por MTT

Para analizar la viabilidad de los cultivos se utilizó el ensayo de MTT [bromuro de 3-(4,5-dimetietiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolium]³⁶⁵ de Sigma, que mide la actividad metabólica mitocondrial de la célula. Este ensayo se basa en la ruptura de las sales de tetrazolio (MTT) en cristales de formazán de color violeta insolubles en agua. Esta reacción sólo se producen en las células viables mediante una deshidrogenasa mitocondrial.

Una vez realizado el experimento pertinente, se añadió MTT al cultivo a una concentración final de 1mg/ml (250µl volumen final/pozo de 96) y la placa de cultivo se incubó durante 1h a 37°C. Debido a la baja tasa proliferativa de las MSC en comparación con las células tumorales, la detección de su viabilidad celular se realizó a partir de una concentración superior de MTT (2.5mg/ml de MTT) durante 2h. Después de esta incubación, se aspiró el medio con mucho cuidado y los cristales fueron solubilizados en DMSO (200µl/pocillo de 96). Una vez disueltos, se midió la densidad óptica de la solución en un lector de ELISA a 540nm. El valor de absorbancia obtenido correlacionó con la viabilidad de la muestra (número de células metabólicamente activas).

2.11. Experimento de sensibilidad a docetaxel

Para determinar la sensibilidad a docetaxel de las células mMSC-GFP en comparación con la línea tumoral NP18, se sembraron 2×10^3 células mMSC-GFP ó 5×10^3 células NP18 por pocillo en placas de 96 pocillos y se incubaron por triplicado con diluciones seriadas de docetaxel, desde 3 a 12.500 pg/ml (dilución 1/4). Al cabo de 13 días de tratamiento, se midió la viabilidad celular de los pozos tratados mediante un ensayo de MTT. El porcentaje de viabilidad celular fue calculado mediante la ecuación $T/NT \times 100$, donde la T es la viabilidad celular de las células tratadas y la NT es la viabilidad celular de las células no tratadas.

Para determinar la sensibilidad a docetaxel de las células rFLMSC, rFLMSCMDR y rFLMSCMDR/FCU, en comparación con las NP18, se sembraron 5×10^3 células por pocillo en placas de 96 pocillos y se incubaron por triplicado con diluciones seriadas de docetaxel, desde 98 a 100.000 pg/ml (dilución 1/2). Al cabo de 6 días de tratamiento, se midió la viabilidad del cultivo celular por MTT.

2.11. Experimento de efecto colateral

Para evaluar el efecto colateral de las células rFL-MSC modificadas con el gen FCU se sembró por triplicado una mezcla celular formada por células NP18 y una proporción creciente de células rFL-MSC modificadas (0%, 0.4%, 0.8%, 1.6%, 3.1%, 6.3%, 12.5%, 25%, 50% y 100%) (5×10^3 células totales/pocillo). Estas mezclas se cultivaron en placas de 96 pocillos y se trataron con 130 μ g/ml de 5-FC. Después de 6 días de tratamiento, se calculó el porcentaje de viabilidad celular por MTT. Debido a que la intensidad de detección de las MSC es inferior a la de las células NP18, se utilizó como controles pozos con la misma proporción de MSC pero sin tratamiento con 5-FC.

2.12. Experimentos de selección positiva en cultivos celulares

2.12.1. Selección positiva de las mMSC-GFP

La determinación del enriquecimiento de las mMSC-GFP en un cultivo celular con NP18 se realizó en placas de 96 pocillos. Para ello, se mezclaron células tumorales NP18 con una proporción creciente de mMSC-GFP por triplicado (5×10^3 células totales/pocillo) y se incubaron con docetaxel (concentración final 0.8ng/ml).

A los 7 días después del tratamiento, se tripsinizó el cultivo, se contaron las células GFP positivas en una cámara de Neubauer y se calculó la proporción de células positivas para GFP, respecto al total de células, en cada una de las condiciones.

2.12.2. Selección positiva de las rFL-MSC-MDR/FCU-GFP

El enriquecimiento de las rFL-MSC-MDR/FCU-GFP se determinó a partir de mezclas celulares formadas por células NP18 y células rFL-MSC-MDR/FCU-GFP (5×10^3 células totales/pocillo). Las mezclas celulares se incubaron con docetaxel (concentración final 16ng/ml) por triplicado y al cabo de 8 días, se tomaron imágenes (100x) representativas, con un microscopio de fluorescencia, de cada una de las condiciones.

3. TÉCNICAS DE EXPERIMENTACIÓN CON ANIMALES

3.1. Modelo animal

Para realizar los experimentos *in vivo* de esta tesis se utilizaron ratones inmunodeprimidos BALB/c nu/nu (Harlan), machos, de 4-6 semanas de edad y con un peso medio de 30 gramos. Estos animales se mantuvieron en el estabulario de l'Institut d'Investigació Biomèdica de Bellvitge (IDIBELL), Barcelona, España, de acuerdo con las recomendaciones de la AAALAC (Association for Assessment and Accreditation of Laboratory Animal Care International) y se han manipulado de acuerdo con las recomendaciones del Comité Ético de Experimentación Animal del IDIBELL.

3.2. Implantación y medida de los tumores

Las células fueron sembradas en placas de cultivo de 15cm de diámetro. En el momento de la implantación, las células se tripsinizaron, se lavaron con PBS y se contaron. Para la generación de los tumores mixtos, se mezcló una cantidad de células tumorales NP18 fija, para cada experimento, y un porcentaje variable de MSC. Esta mezcla celular se centrifugó a 1.250 rpm durante 5 minutos y el pellet de células fue resuspendido en el volumen necesario para la implantación de los tumores (150µl/tumor). Esta implantación se realizó mediante la inoculación subcutánea de los 150µl de mezcla celular en los dos flancos posteriores del animal, con una aguja hipodérmica de 25G. Después de la implantación, se hizo un seguimiento del crecimiento tumoral por palpación y, cuando aparecieron todos los tumores, se empezaron a medir, entre dos y tres veces por semana, con un pie de rey. El volumen tumoral se calculó de acuerdo con la siguiente ecuación:

$$\text{Volumen}(\text{mm}^3) = A \times B^2 \times (\pi/6)$$

Donde *A* y *B* son la dimensión mayor y la dimensión menor del tumor, medido en mm, respectivamente.

3.3. Tratamiento de los animales con docetaxel

Antes de la administración se preparó la solución de trabajo (3.1 mg/ml en suero fisiológico) a partir de la solución estoc de docetaxel (10mg/ml). Ésta se inyectó de forma intraperitoneal, con una aguja de 25G, a una dosis de 25mg/kg, en un volumen de 200-300µl, un día a la semana, durante 3 semanas.

3.4. Obtención y fijación de los tumores para la criopreservación de la GFP

Los ratones se sacrificaron por dislocación cervical y los tumores subcutáneos se extrajeron utilizando material quirúrgico. Una vez extraídos, se lavaron con suero fisiológico y se fijaron con una solución de PFA al 4%, a temperatura ambiente, durante 12-24h dependiendo del tamaño de la muestra. Posteriormente, las muestras se lavaron con PBS, para eliminar el exceso de fijador, y se crioprotegieron por inmersión en soluciones crecientes de sacarosa:

- Sacarosa 5 % en PBS, 2h a 4°C
 - Sacarosa 10 % en PBS, 2h a 4°C
 - Sacarosa 30% en PBS, toda la noche, a 4°C
- (En total un mínimo de 12h)

Una vez finalizado este proceso, los tumores se colocaron en moldes especializados, se les añadió OCT y se congelaron rápidamente en nieve carbónica. Una vez congeladas, las muestras se almacenaron en un congelador de -80°C.

3.5. Análisis de la GFP en los tumores criopreservados en OCT

Para analizar los tumores criopreservados se partió de las muestras incluidas en OCT y se realizaron criosecciones de 5 μm con un criotomo (Global Medical Instrumentation, Shandon Cryotome Cryostat, Ramsey, Minnesota), que nos permitió mantener las muestras congeladas entre -20 y -30°C. Las secciones se montaron en un portaobjetos, previamente tratado con polilisina (Sigma), para favorecer la adhesión de la muestra, y se le añadió medio de montaje con DAPI (Vectashield, vector Laboratories, Inc., Burlingame, CA). La expresión de la GFP se determinó mediante un microscopio de fluorescencia (Olympus BX51) y se tomaron imágenes representativas (x200) de tres tumores de cada grupo.

3.6. Ensayo de persistencia de las rFL-MSD-MDR/FCU-GFP en tumores NP18

Se implantaron una cantidad fija de 2.5×10^6 células NP18 por tumor, mezcladas con un 10% de rFL-MSD-MDR/FCU-GFP. A día 20 postimplantación, los ratones fueron sacrificados, se extrajeron los tumores (n=8) y se analizó la expresión de la GFP.

3.7. Experimentos de selección positiva *in vivo*

Para evaluar el enriquecimiento de las MSC modificadas después del tratamiento con docetaxel, se implantaron tumores formados por una cantidad fija de células tumorales NP18 y una proporción variable de MSC modificadas. Una vez estos tumores alcanzaron un volumen tumoral entre 100-200mm³, se sacrificaron unos ratones a día 0 y se extrajeron los tumores (n=6), para analizar la proporción de MSC modificadas en el tumor antes del tratamiento. En este punto, los animales fueron distribuidos de forma aleatoria en dos grupos (PBS y docetaxel) (n=10) y tratados con docetaxel (25 mg/Kg intraperitoneal, una vez a la semana, durante 3 semanas). Cuando los tumores alcanzaron un tamaño entre los 200-300mm³, los ratones fueron sacrificados y se extrajeron los tumores. Estos tumores se fijaron en OCT, siguiendo el protocolo de criopreservación de la GFP, y se analizó la expresión de la GFP.

3.7.1. Selección positiva de las mMSC-GFP

En este experimento se implantaron 4x10⁶ células NP18 por tumor mezcladas con un 3% ó un 11% de mMSC-GFP. A día 10 postimplantación, se empezó el tratamiento con docetaxel, durante 3 semanas, y a día 21 se sacrificaron los ratones del grupo PBS. Entre día 52 y día 62, dependiendo del tamaño tumoral, los ratones del grupo docetaxel fueron sacrificados y se analizó la expresión de la GFP.

3.7.2. Selección positiva de las rFL-MSC-MDR/FCU-GFP

En el segundo experimento se implantaron 1x10⁷ células NP18 por tumor mezcladas con un 3% de rFL-MSC-MDR/FCU-GFP ó un 3% de mMSC-GFP y, el día después de la implantación, los ratones fueron tratados con docetaxel semanalmente, hasta el momento de su sacrificio. Los ratones del grupo PBS se sacrificaron a día 14 postimplantación y los ratones del grupo docetaxel entre día 34 y día 44, según el tamaño tumoral.

ANEXO II: RESULTADOS

Recientemente, se ha demostrado que las MS tienen un tropismo hacia las lesiones tumorales después de su administración sistémica. En concreto, estas células madre han sido utilizadas para transportar genes suicidas hacia las células tumorales. Diversos estudios también apuntan a que estas células ejercen una función estructural en el tumor, dando lugar a los fibroblastos asociados a tumor (TAFs). Por estas características, nos planteamos si estas MSC modificadas con genes suicidas podían enriquecerse en un tumor con una droga de selección, para después ser eliminadas con una prodroga. El efecto colateral del sistema suicida permitiría eliminar las células tumorales adyacentes a las MSC modificadas.

Para probar este concepto las mMSC fueron extraídas a partir del tejido adiposo de ratón y mantenidas en cultivo. Una vez tuvimos un cultivo estable, marcamos estas células con un retrovirus GFP para detectarlas por fluorescencia. Lo primero que determinamos fue la sensibilidad a docetaxel de las mMSC comparada con la línea celular NP18. En la **Figura 1** observamos que las mMSC son ligeramente más resistentes a docetaxel que las NP18 *in vitro*.

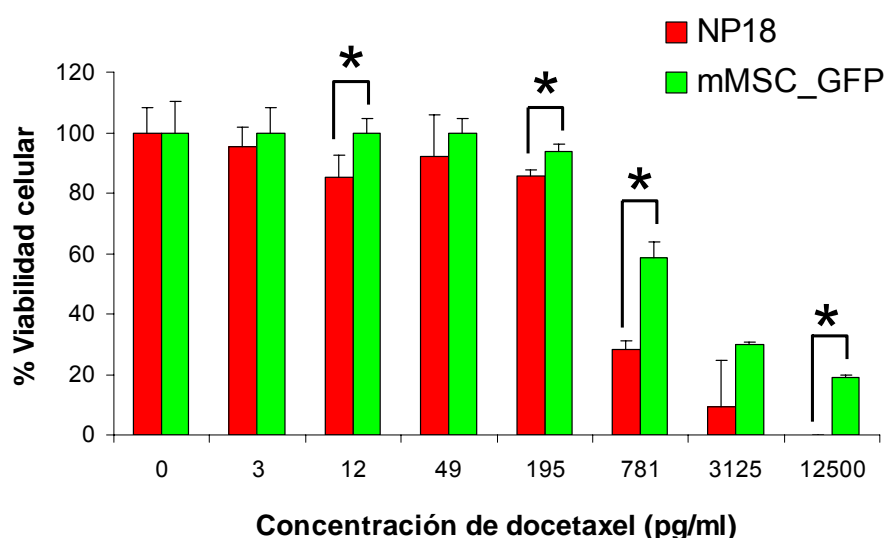


Figura 1. Análisis de la sensibilidad a docetaxel de las mMSC-GFP. Las células NP18 (barras rojas) y las células mMSC-GFP (barras verdes) se sembraron en placas de 96 pocillos y se incubaron con concentraciones crecientes de docetaxel (de 3 a 12.500 pg/ml). Trece días después del tratamiento, se calculó la viabilidad celular.

El siguiente paso fue evaluar si esta ligera resistencia innata de las mMSC permitía seleccionarlas positivamente en una mezcla celular con NP18, después del tratamiento a bajas dosis de docetaxel. En la **Figura 2** observamos un incremento de la población mMSC en los pozos tratados con docetaxel respecto a las no tratadas.

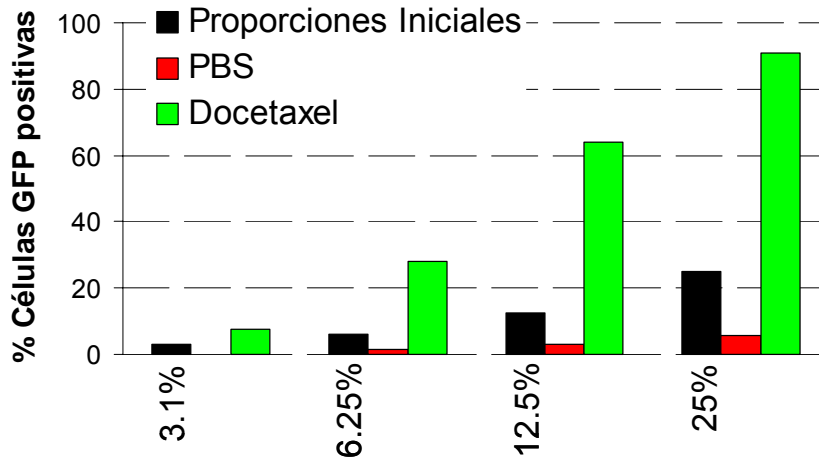


Figura 2. Enriquecimiento de las mMSC-GFP después del tratamiento con docetaxel. Las células NP18 fueron mezcladas con una proporción creciente de mMSC-GFP y se trataron con docetaxel. A los 7 días después del tratamiento, las células fueron tripsinizadas y se cuantificó el porcentaje de células GFP positiva que había en los cultivos. En esta figura se representa la proporción de mMSC-GFP después del tratamiento con PBS (barras rojas) o con docetaxel (barras verdes). Las barras negras representan la proporción de mMSC-GFP sembradas en un inicio, también indicada numéricamente.

Esta selección positiva de las mMSC *in vitro* planteó la posibilidad de utilizar el docetaxel, como droga de selección, para enriquecer esta población en tumores formados por una mezcla de NP18 y mMSC. En los resultados obtenidos en ratones, a pesar de observar algunas colonias GFP positivas en los tumores después del tratamiento con docetaxel, no pudimos determinar una selección positiva clara de esta población respecto a la población parental NP18 (**Figura 3**). Una posible explicación podía ser la baja tasa proliferativa de este tipo celular que impediría la repoblación de las células NP18 que van muriendo por efecto de la droga de selección. Para solucionar esta limitación, utilizamos unas MSC extraídas de hígado fetal de conejo (rFL-MSC), que sabíamos previamente que tenían una tasa proliferativa *in vitro* muy superior a las mMSC. Estas células fueron modificadas con un retrovirus que expresaba el gen de resistencia a multidrogas MDR1 y con otro retrovirus que expresaba el gen suicida FCU. El gen MDR1 permitiría seleccionar positivamente estas células en presencia de docetaxel y el gen FCU eliminarlas en presencia de la prodroga 5-FC. Además, el gen MDR1 estaba unido al gen reportero de la GFP mediante una secuencia IRES, lo que permitía detectar las células modificadas por fluorescencia.

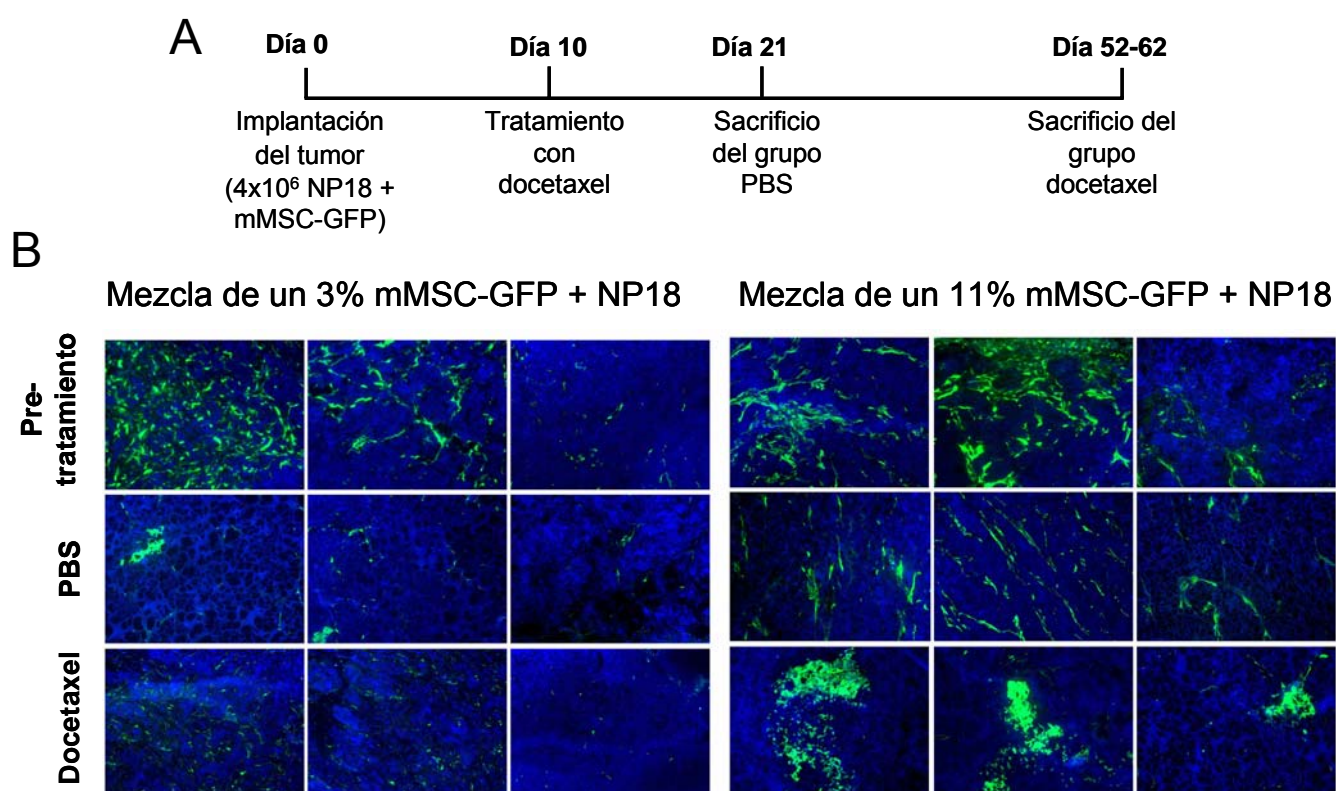


Figura 3. Selección positiva de las mMSC-GFP *in vivo*. Un número fijo de células NP18 (4X10⁶ NP18/tumor) fue mezclado con un 3% ó un 11% de mMSC-GFP e implantado de forma subcutánea en ratones atímicos. Cuando los tumores fueron palpables, se empezó el tratamiento con docetaxel. **A)** Esquema del experimento donde se indican el número de células NP18 implantadas por tumor, el día de tratamiento con docetaxel y el día de sacrificio de los grupos PBS y docetaxel. **B)** Imágenes representativas (x200) de 3 tumores de cada uno de los grupos (grupo pre-tratamiento, grupo control o grupo tratado con docetaxel).

Para confirmar que las MSC modificadas mantenían las propiedades de célula madre, hicimos un ensayo de diferenciación osteogénica y adipogénica. Pudimos comprobar que la transducción con retrovirus y la expresión de los genes exógenos no modificaba las propiedades de diferenciación de estas células (**Figura 4**).

Los ensayos de sensibilidad a docetaxel indicaron que las rFL-MSC-MDR y las rFL-MSC-MDR/FCU presentaban una resistencia a docetaxel significativa, tanto en comparación con las rFL-MSC sin modificar como con las células tumorales NP18 (**Figura 5A**).

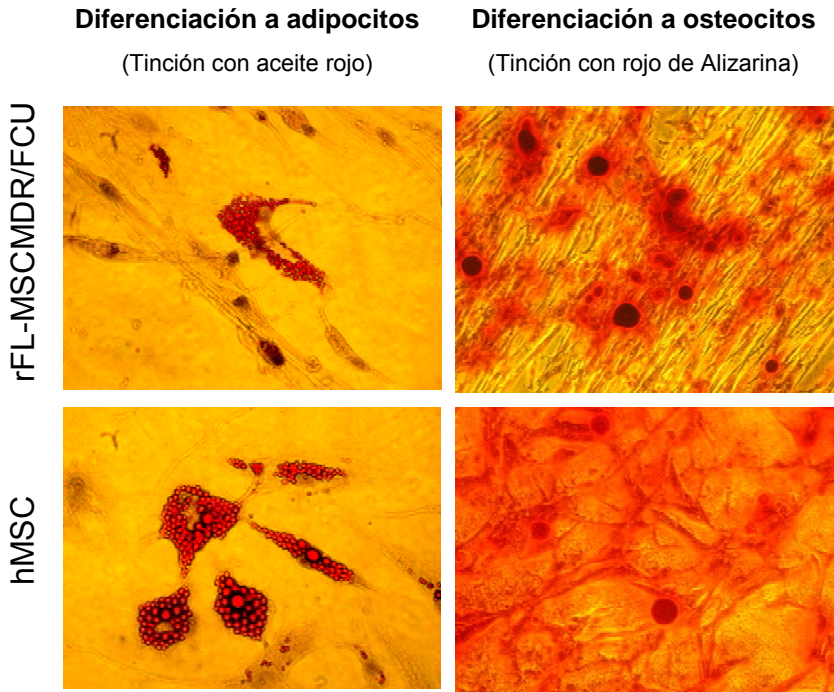


Figura 4. Diferenciación de las rFL-MSC-MDR/FCU a adipocitos y a osteocitos. Después de cultivar las células con medios específicos de diferenciación, los acúmulos de grasa de los adipocitos y los depósitos de calcio de los osteoblastos fueron teñidos con aceite rojo y rojo de alizarina, respectivamente.

Para la evaluación de la eficacia de la terapia génica suicida *in vitro*, se determinó el efecto colateral de las rFL-MSC modificadas con el gen suicida FCU, en presencia de células NP18. Los resultados mostraron que partir de bajas proporciones de células modificadas se podía disminuir considerablemente el crecimiento de las células NP18. Aún así, era necesario un 50% de rFL-MSC que expresasen el gen FCU para eliminar más del 90% del cultivo. En este experimento no se apreciaron diferencias de eficacia entre las células que expresaban el gen FCU o las células que expresaban los dos genes de selección (MDR/FCU) (Figura 5B).

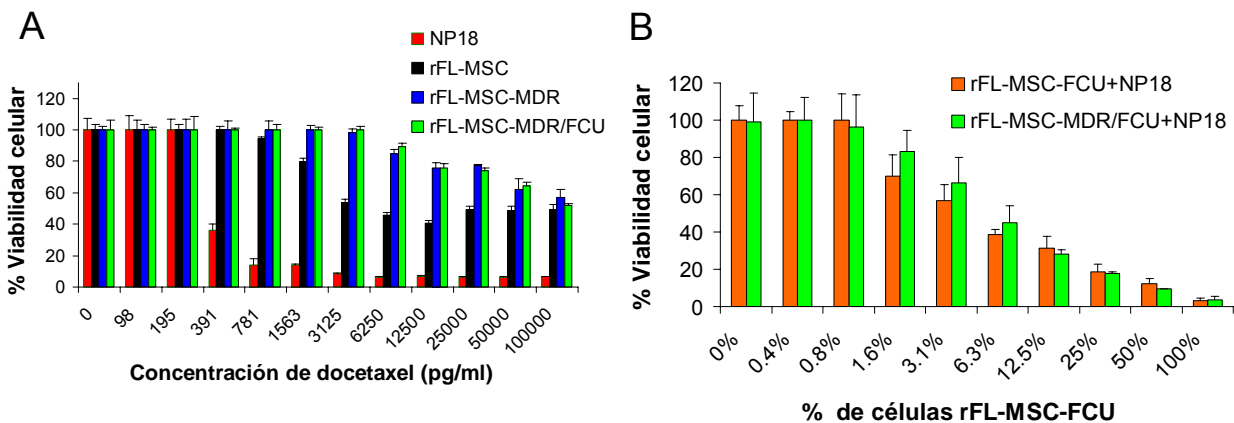


Figura 5. Caracterización funcional de las células rFL-MSC modificadas. A) Las células NP18 (barras rojas), rFL-MSC (barras negras), rFL-MSC-MDR (barras azules) y rFL-MSC-MDR/FCU (barras verdes) se sembraron en placas de 96 pocillos, se incubaron con concentraciones crecientes de docetaxel (de 98 a 100.000 pg/ml) y, al cabo de 6 días de tratamiento, se calculó la viabilidad celular. Para simplificar la figura no se han representado las diferencias estadísticas entre grupos. **B)** Para determinar el efecto colateral de las células rFL-MSC-MDR/FCU se sembró una mezcla de células tumorales NP18 con una proporción creciente de células rFL-MSC-FCU (barras naranjas) o de rFL-MSC-MDR/FCU (barras verdes) y se trataron con 5-FU. Después de 6 días de tratamiento, se determinó el porcentaje de viabilidad celular del cultivo.

Una vez confirmado el efecto del gen de selección (MDR) y del gen suicida (FCU) en las rFL-MSC modificadas, se estudió el enriquecimiento de estas células en cultivos mixtos con células NP18. Los resultados de este experimento mostraron que era posible seleccionar positivamente la población de rFL-MSC-MDR/FCU después del tratamiento con docetaxel (**Figura 6**).

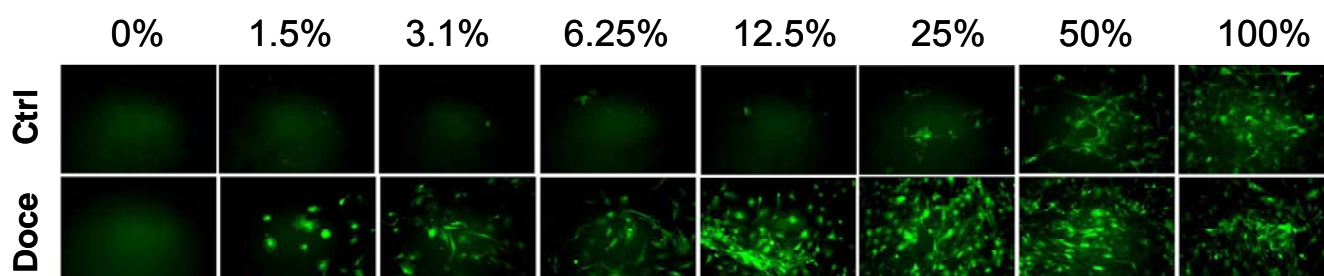


Figura 6. Selección positiva de las células rFL-MSC-MDR/FCU con docetaxel. Las células NP18 fueron mezcladas con una proporción creciente de células rFL-MSC-MDR/FCU y se trataron con docetaxel. La tira superior de imágenes muestra una imagen representativa de las células GFP positiva en los pozos controles mientras que la tira de inferior muestra imágenes de los pozos tratados con docetaxel.

Una vez demostrada la eficacia de nuestro modelo *in vitro*, pasamos a evaluar la persistencia de las rFL-MSC-MDR/FCU en tumores NP18 implantados en ratones. Para ello, implantamos tumores en ratones a partir de una mezcla celular formada por un 90% de células NP18 y un 10% de rFL-MSC modificadas (**Figura 7A**). El análisis de las secciones tumorales mostró una ausencia de expresión de GFP, lo que indicaba una baja persistencia de las rFL-MSC-MDR/FCU en los tumores NP18 (**Figura 7B-D**).

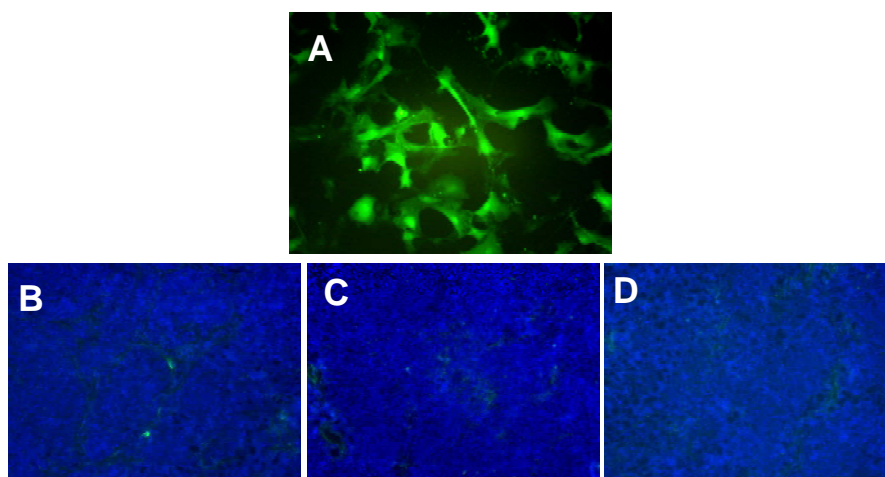


Figura 7. Persistencia de las rFL-MSC-MDR/FCU-GFP en un tumor formado por células NP18. Un número fijo de células NP18 (2.5×10^6 NP18/tumor) fue mezclado con un 10% de rFL-MSC-MDR/FCU-GFP e implantado de forma subcutánea en ratones. Después de 20 días, los ratones fueron sacrificados, se extrajeron los tumores ($n=8$) y se analizó la expresión de GFP. **A)** Imagen representativa de la proporción de rFL-MSC-MDR/FCU-GFP en la mezcla celular antes de ser implantada en los ratones. **B, C y D)** Imágenes representativas de la expresión de GFP de 3 tumores 20 días postimplantación.

La agresividad y la alta tasa de crecimiento de los tumores NP18 en ausencia de la droga de selección podía explicar estos resultados. En ausencia de docetaxel, las rFL-MSC-MDR/FCU presentaban una desventaja selectiva en comparación con las NP18, lo que podía inducir su muerte. Con la finalidad de favorecer el crecimiento de las MSC modificadas desde un inicio, se diseñó un experimento similar al anterior, en el que los animales fueron tratados con docetaxel desde el siguiente día de la implantación de los tumores. Este experimento se realizó en tumores mixtos con un 3% inicial de rFL-MSC-MDR/FCU o de mMSC-GFP. A pesar de adelantar el tratamiento, las secciones tumorales mostraron una baja proporción de células GFP positivas, en ambos tipos de tumores (**Figura 8**).

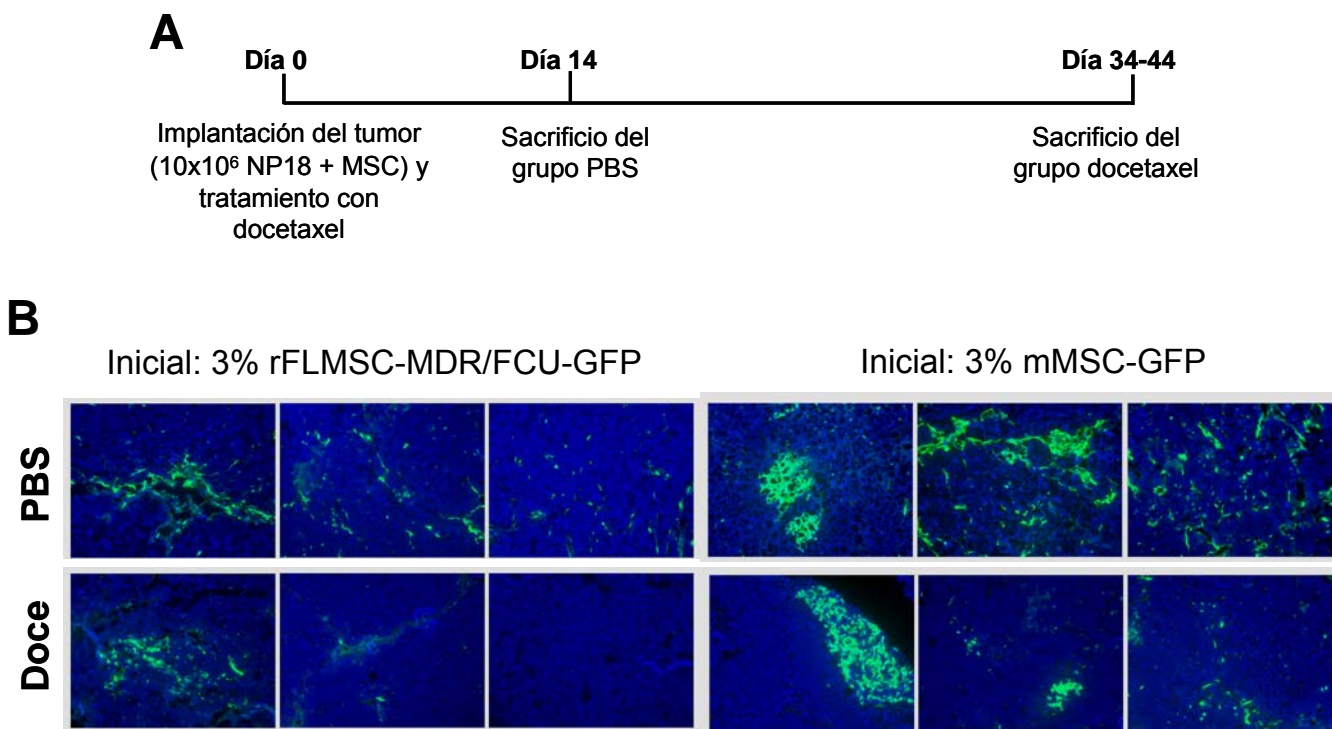


Figura 8. Selección positiva de las MSC modificadas durante el tratamiento inicial de docetaxel. Un número fijo de células NP18 (1×10^7 NP18/tumor) fue mezclado con un 3% de rFL-MSC-MDR/FCU-GFP ó un 3% de mMSC-GFP e implantado de forma subcutánea en ratones. Al día siguiente de la implantación, estos ratones fueron tratados con docetaxel o con PBS, semanalmente, hasta el momento de su sacrificio. **A)** Esquema del experimento, donde se indican el número de células NP18 implantadas por tumor y el día de sacrificio de los animales. **B)** Imágenes representativas (x200) de 3 tumores del grupo control o del grupo tratado con docetaxel para las dos condiciones iniciales (3% rFL-MSC-MDR/FCU-GFP ó 3% de mMSC-GFP).

*ANEXO III: PUBLICACIONES
RELACIONADAS*

En estos años en el laboratorio, además de realizar el trabajo mostrado en esta tesis doctoral, también he participado en otros proyectos que han dado lugar a varias publicaciones. En este **ANEXO III**, se presentan las publicaciones en las que he colaborado.

Bioselection of a Gain of Function Mutation that Enhances Adenovirus 5 Release and Improves Its Antitumoral Potency

A Gros, J Martínez-Quintanilla, C Puig, S Guedan, D.G Molleví, R Alemany, and M Cascallo
Cancer Research 2008; 68: (21). November 1, 2008

Bioselection of a Gain of Function Mutation that Enhances Adenovirus 5 Release and Improves Its Antitumoral Potency

Alena Gros, Jordi Martínez-Quintanilla, Cristina Puig, Sonia Guedan, David G. Molleví, Ramon Alemany, and Manel Cascallo

Translational Research Laboratory, IDIBELL-Institut Català d'Oncologia, L'Hospitalet de Llobregat, Barcelona, Spain

Abstract

Genetic bioselection of a mutagenized Ad5wt stock in human tumor xenografts led us to isolate AdT1, a mutant displaying a large-plaque phenotype *in vitro* and an enhanced systemic antitumor activity *in vivo*. AdT1 phenotype correlates with an increased progeny release without affecting total viral yield in different human tumors and cancer-associated fibroblasts. An approach combining hybrid Ad5/AdT1 recombinants and sequencing identified a truncating insertion in the endoplasmic reticulum retention domain of the E3/19K protein (445A mutation) which relocates the protein to the plasma membrane and is responsible for AdT1's enhanced release. E3/19K-445A phenotype does not correlate with the protein's ability to interact with MHC-I or induce apoptosis. Intracellular calcium measurement revealed that the 445A mutation induces extracellular Ca^{2+} influx, deregulating intracellular Ca^{2+} homeostasis and inducing membrane permeabilization, a viroporin-like function. E3/19K-445A mutants also display enhanced antitumoral activity when injected both intratumorally and systemically in different models *in vivo*. Our results indicate that the inclusion of mutation 445A in tumor-selective adenoviruses would be a very powerful tool to enhance their antitumor efficacy. [Cancer Res 2008;68(21):8928–37]

Introduction

Tumor-selective viruses are being engineered to treat cancer (1). Different strategies have been used to render adenovirus tumor specific (2). Results to date have shown a good security/toxicity profile for multiple modes of delivery. Flu-like symptomatology has been reported as the most common toxicity, especially after i.v. delivery, along with transient transaminitis and, occasionally, thrombocytopenia (3). Antitumor effects have also been described after intratumoral or intracavitary injection, and the potential for synergy with chemotherapy is very promising (4). However, systemic antitumoral response rates range only from minimal to moderate after systemic administration (5, 6).

One of the reasons that explain the poor response to oncolytic adenovirus after i.v. administration is the biodistribution profile of adenovirus 5 (Ad5), a non-blood-borne virus that is quickly cleared from the bloodstream after i.v. administration and accumulates in the liver within minutes due to the particular hepatic architecture and vascular system (7, 8). The presence of the host immune

system may also be determinant in the response to oncolytic adenoviruses, although its exact role is not clear, with some discrepancies between preclinical data and clinical results (9, 10). In addition, other biological barriers within the tumor mass (for example, the tumor stroma matrix) also limits adenovirus oncolysis by hindering the spread of the virions (11, 12).

Improving adenovirus potency has been postulated as an important step to overcome all these limitations (13). One approach to render adenoviruses more cytotoxic is arming oncolytic adenoviruses with transgenes that are able to eliminate surrounding cells and favor spreading of the oncolytic effect. With this aim, several proteins have been incorporated into the adenovirus backbone, including the adenovirus death protein (14), p53 (15), different prodrug-converting enzymes (16), and immunomodulators (17). Although successful results have been obtained with some of these constructs, the utility of this strategy has been often limited by the small cloning capacity of most oncolytic adenoviruses after the insertion of the genetic elements required to confer selectivity.

Bioselection of randomly mutagenized adenovirus by repeated passaging in defined conditions can also be used as a strategy for the isolation of mutants that exhibit potent and/or tumor-selective phenotypes. This genetic selection has the potential to assign novel functions to viral genes. For example, new mutants of human Ad5 with enhanced oncolytic activity were isolated after repeated passage of a randomly mutagenized pool in a human colorectal cancer cell line *in vitro* (18). A point mutation that induced a COOH terminal truncation in the i-leader protein, resulting in its early accumulation, was shown to be essential for the mutant phenotype (18). Interestingly, the relevance of such mutations in the i-leader protein has been further confirmed by another study (19).

With the aim of selecting Ad5 mutants with enhanced antitumor activity, we have extended the genetic selection approach by including the *in vivo* tumor environment as selective pressure. A mutant isolated from tumors, AdT1, displayed an increased antitumor activity *in vivo* and large-plaque phenotype *in vitro*. Further characterization showed that AdT1 presented an improved viral release without affecting the overall yield in both human tumor cells and cancer-associated fibroblasts. A combined approach including sequencing and analysis of recombinants revealed that the presence of a mutation in the endoplasmic reticulum retention domain of the E3/19K protein was responsible for the phenotype. We propose that the expression of the mutated form of E3/19K is able to disturb intracellular Ca^{2+} homeostasis and ultimately create membrane lesions that allow enhanced virus release.

Materials and Methods

Cell lines and viruses. Human HEK293, A549, FaDu, SKMel-28, and NP-9 (20) cell lines and hamster pancreatic tumor HP-1 cells (21) were grown in

Note: Supplementary data for this article are available at Cancer Research Online (<http://cancerres.aacrjournals.org/>).

Requests for reprints: Manel Cascallo, IDIBELL-Institut Català d'Oncologia, Av Gran Via s/n km 2,7, L'Hospitalet de Llobregat, 08907 Barcelona, Spain. Phone: 34-93-2607463; Fax: 34-93-2607466; E-mail: mcascallo@iconcologia.net.

©2008 American Association for Cancer Research.
doi:10.1158/0008-5472.CAN-08-1145

DMEM supplemented with 5% fetal bovine serum (FBS). CAF1 cells, human carcinoma-associated fibroblasts, were isolated and characterized in our laboratory from an hepatic metastasis of a human colorectal carcinoma and were maintained in DMEM-F12 supplemented with 10% FBS and BD MITO⁺ serum extender (Becton Dickinson). When evaluating effects of extracellular Ca²⁺, CAF1 cells were seeded in fibronectin-coated dishes. To obtain >80% infection, 293, A549, FaDu, DLD-1, SKMel-28, NP-9, CAF1 and HP-1 cells were infected with 5, 20, 25, 15, 25, 30, 45, and 50 transducing units (TU) per cell, respectively. As calcium-containing medium, a Ca²⁺-free medium to which CaCl₂ was added to a final concentration of 1.8 mmol/L was used. Calcium-free medium was supplemented with 0.5 mmol/L EGTA immediately before use. Human Ad5 was obtained from American Type Culture Collection (ATCC). AdTL (AdGFPLuc) has been previously described (22). Oligonucleotides were designed to sequence Ad5 and AdT1 entire viral genomes.

Random mutagenesis and *in vivo* selection. An Ad5 stock was randomly mutagenized with nitrous acid (23) and the 8 min-treated stock (1,000-fold loss of virus viability; average of nine mutations per genome) was chosen for the first round of *in vivo* selection. Mutations were fixed, and the mutagenized stock was subsequently amplified and purified by passage at a high TU per cell in A549 cells to prevent *in vitro* selection of mutants. For each round of *in vivo* selection, 1 × 10⁷ NP-9 cells were injected s.c. into the flanks of male BALB/c *nu/nu* mice. Animal studies were performed in the IDIBELL facility (AAALAC unit 1155) and approved by the IDIBELL's Ethical Committee for Animal Experimentation. Once the tumors reached 100 mm³, mice were injected with PBS, Ad5, or the mutagenized Ad5 stock at 2 × 10¹⁰ vp by tail vein. At 4 h postinjection, blood was drawn from the tail and the titer was determined by an anti-hexon staining method. Body weights of the animals were monitored, and tumor volume was calculated as previously described (11). The virus mutants with superior blood persistence were amplified from a blood sample of the mouse that displayed the best tumor growth inhibition and were chosen for the next round of *in vivo* selection. After the fourth round of bioselection, the virus mutants were extracted from the tumor that showed the most pronounced tumor growth inhibition. The AdT1 mutant was isolated from the resulting tumor cell lysate by plaque assay in A549 cells.

Construction of Ad5/AdT1 recombinants and E3/19K modified viruses. Homologous recombination for the generation of modified viruses was performed in yeast. The yeast replication elements and a selectable marker were cloned into pAd5 plasmid (ref. 24; pAd5CAU). Homologous recombination between different fragments of pAd5CAU and AdT1 genome (represented schematically in Fig. 2A) resulted in the generation of the different Ad5/AdT1 recombinants used to map the mutation(s) responsible for the large-plaque phenotype of AdT1. Plasmids pAdE3/19K-445A, pAdE3/19K-445ACS40, pAdE3/19K-KS, pAdE3/19K-CS40, and pAdE3/19K-del (Supplementary Table S1) were constructed by recombination of pAd5CAU with PCR-modified E3/19K sequences, and the incorporated modifications were sequenced. Viruses were generated in 293, propagated in A549, and quantified using the anti-hexon staining-based method using 293 cells (24). Briefly, this method consists in the infection of 293 cells with serial dilutions of a virus sample. Thirty-six hours postinfection, cells were fixed with methanol and incubated with mouse anti-hexon (2Hx-2 hybridoma, ATCC) and Alexa 488-labeled goat anti-mouse (Molecular Probes) during 1 h at 37°C. The similar late protein expression pattern showed by the viruses (Supplementary Fig. S2B) assured this method was suitable for the titration of the mutant viruses generated.

Virus release and production assays. 293, A549, CAF1, NP-9, FaDu, SKMel-28, DLD-1, or HP-1 cells were infected to allow 80% to 100% infection. Three hours later, infection medium was removed and cells were washed twice with PBS and incubated with fresh medium. At the indicated time points a fraction of the supernatant (SN) and the cell-media suspension (CE) were harvested. Viral titers were determined in triplicate according to an anti-hexon staining-based method, as described above. For experiments in which the effects of extracellular calcium were assayed, cells were infected, and medium was removed 24 h later, the cells were washed twice with PBS (-CaCl₂/-MgCl₂) and subsequently incubated with normal or Ca²⁺-free medium.

***In vitro* cytotoxicity assay.** Cytotoxicity assay was performed by seeding 30,000 A549 cells, 10,000 NP-9 cells, or 50,000 DLD-1 cells per well in 96-well plates in DMEM with 5% FBS. Cells were infected with serial dilutions starting with 90 TU/cell for A549, 250 TU/cell for NP-9, and 20 TU/cell for DLD-1 cells. At day 5 postinfection, plates were washed with PBS and stained for total protein content (bicinchoninic acid assay, Pierce Biotechnology) and absorbance was quantified. The TU per cell required to produce 50% inhibition (IC₅₀ value) was estimated from dose-response curves by standard nonlinear regression (GraFit; Erithacus Software), using an adapted Hill equation.

Western blot analysis. A549 cells were either mock-infected or infected to allow >80% infection, and protein cell extracts were prepared 24 h postinfection with Iso-Hi-pH buffer [0.14 mol/L NaCl, 1 mmol/L MgCl₂, 10 mmol/L Tris-HCl (pH 8.5), 0.5% Nonidet P-40]. Protein samples (20 µg/lane) were separated by SDS/PAGE and transferred to membranes. Blots were probed with the following antibodies: anti-E3/19K (ref. 25; Tw1.3 that recognizes a luminal epitope of the protein kindly provided by Dr. Yewdell, NIAID/NIH), anti-E1A (clone 13S-5, Santa Cruz Biotechnology), anti-Ad5 virion proteins (ab6982, Abcam), anti-human poly(ADP-ribose) polymerase (PARP; clone 551024, Becton Dickinson), or anti-adenovirus death protein (ADP; specific for residues 63–77 of the Ad2 ADP sequence kindly provided by Dr. W.S.M. Wold, St. Louis University; ref. 26).

E3/19K and MHC-I membrane expression analysis by fluorescence-activated cell sorting. Cell surface expression of E3/19K and MHC class I in virus-infected cells was analyzed in A549 cells using anti-E3/19K (Tw1.3) and anti-human MHC-I (W6/32, ATCC), respectively. Twenty-four hours postinfection, fluorescence profiles were obtained in triplicate by analyzing 10,000 viable cells by flow cytometry (FACSCalibur, Becton Dickinson) using 488-nm laser and CellQuest Pro software (Becton Dickinson).

Propidium iodide uptake and measurement of intracellular Ca²⁺ concentration. A549 or CAF1 monolayers were infected to obtain 80% infection. Cells were harvested at various times postinfection. For permeability studies, suspensions were incubated with 1 µg/mL propidium iodide (PI; Bender Medsystems) for 15 min at room temperature. The number of permeable cells was determined in triplicate by flow cytometry (FACSCalibur, Becton Dickinson). To determine intracellular Ca²⁺ concentration, cells were incubated with 10 µmol/L Fluo-3 acetoxymethyl ester (AM) and 20 µmol/L Fura-red AM (Invitrogen) indicators, as previously described (27). The loaded A549 cells were analyzed in triplicate by flow cytometry (FACSCalibur, Becton Dickinson).

Evaluation of antitumor efficacy *in vivo*. Pancreatic human NP-9 tumor xenografts were established s.c. into the flanks of BALB/c *nu/nu* mice as described above. To evaluate systemic efficacy of the viruses carrying E3/19K-445A mutation, mice with 100 mm³ tumors (*n* = 10 per group) were treated with a single i.v. injection of PBS, Ad5, AdT1, or AdE3/19K-445A (2 × 10¹⁰ vp/mouse in 150 µL PBS). The VP/TU ratio of the purified virus stocks used for the *in vivo* efficacy experiments was similar as shown in Supplementary Table S2. To evaluate intratumoral efficacy, 100 mm³ tumors (*n* = 10 per group) were treated with a single intratumoral injection of PBS, Ad5, AdT1, or AdE3/19K-445A (2 × 10⁹ vp/tumor in 25 µL PBS). To evaluate the efficacy of E3/19K-445A mutants in an immune competent model, HP-1 tumors were induced in the flanks of female 5-wk-old immune competent Syrian (golden) hamsters (*Mesocricetus auratus*) by s.c. inoculation of 1 × 10⁶ cells. Once tumors reached 150 to 170 mm³, hamsters were randomized (*n* = 10 per group), and a single intratumoral injection was performed with Ad5 or AdT1 at 2.5 × 10¹⁰ vp/tumor in 25 µL PBS or with PBS. In each model, tumor sizes and animal body weights were recorded and tumor volume and growth were calculated according to the corresponding formulas. The two-tailed Student's *t* test was used for comparing the tumor progression in mice in the different treatment groups.

Intratumoral adenovirus detection. Adenovirus immunofluorescence in hamster tumors was performed as previously described (24). Briefly, OCT-embedded sections from HP-1 tumors obtained at day 29 after virus administration were treated with polyclonal anti-adenovirus (clone Ab6982, Abcam Ltd.) and Alexa Fluor 488-labeled goat anti-rabbit (Molecular Probes) antibodies and counterstained with 4',6-diamino-2-phenylindole. Stained slides were analyzed under a fluorescent microscope (Olympus BX51).

Results

***In vivo* bioselection of Ad5 mutants with enhanced oncolytic efficacy.** A purified stock of wild-type human Ad5 was randomly mutated with nitrous acid as previously described (23). The mutagenized stock was amplified in human lung adenocarcinoma A549 cells and subjected to various rounds of selection *in vivo* in BALB/c *nu/nu* mice harboring s.c. human pancreatic NP-9 tumors to select mutants with improved oncolytic potency (see Materials and Methods). In the fourth round of bioselection, the virus mutants were extracted from the tumor that showed the most pronounced growth inhibition and plaque-purified to isolate clones. One of these clones, AdT1, was further characterized, and the mutations responsible for its phenotype are the main focus of this study.

Characterization of the phenotype of AdT1. To compare the systemic antitumor efficacy of Ad5 and AdT1, mice with s.c. NP-9 tumors were treated with a single i.v. dose of 2×10^{10} vp and the tumor growth was monitored. Mutant AdT1 showed an enhanced antitumor activity compared with Ad5 (Fig. 1A), and this correlated with intratumoral viral replication (not shown).

The enhanced antitumor efficacy displayed by AdT1 *in vivo* was associated with a large-plaque phenotype *in vitro* (Fig. 1B). The plaques of AdT1 in A549 cells appeared earlier and were at least twice as large as the control Ad5 plaques. The AdT1 large-plaque phenotype could result from an increase in the viral yield or an increase in viral release. The measurement of intracellular and extracellular virus in A549 cells showed that AdT1 was released more efficiently from infected cells, whereas the total virus produced was unaffected (Fig. 1C). Because fibroblasts release adenovirus less efficiently than epithelial cells and are relevant target cells in oncolysis of tumors with stroma, we analyzed and confirmed the enhanced release of AdT1 in carcinoma-associated fibroblasts (CAF1; Fig. 1C). This increase in the rate of viral release was also observed in 293 cells and human tumor cell lines from head and neck (FaDu), melanoma (SkMel-28), pancreas (NP-9), and colorectal carcinoma (DLD-1), as well as in hamster pancreatic tumor HP-1 cells (Fig. 1D), confirming that this phenotype was not restricted to the cells used during the bioselection process. The enhanced release also resulted in an

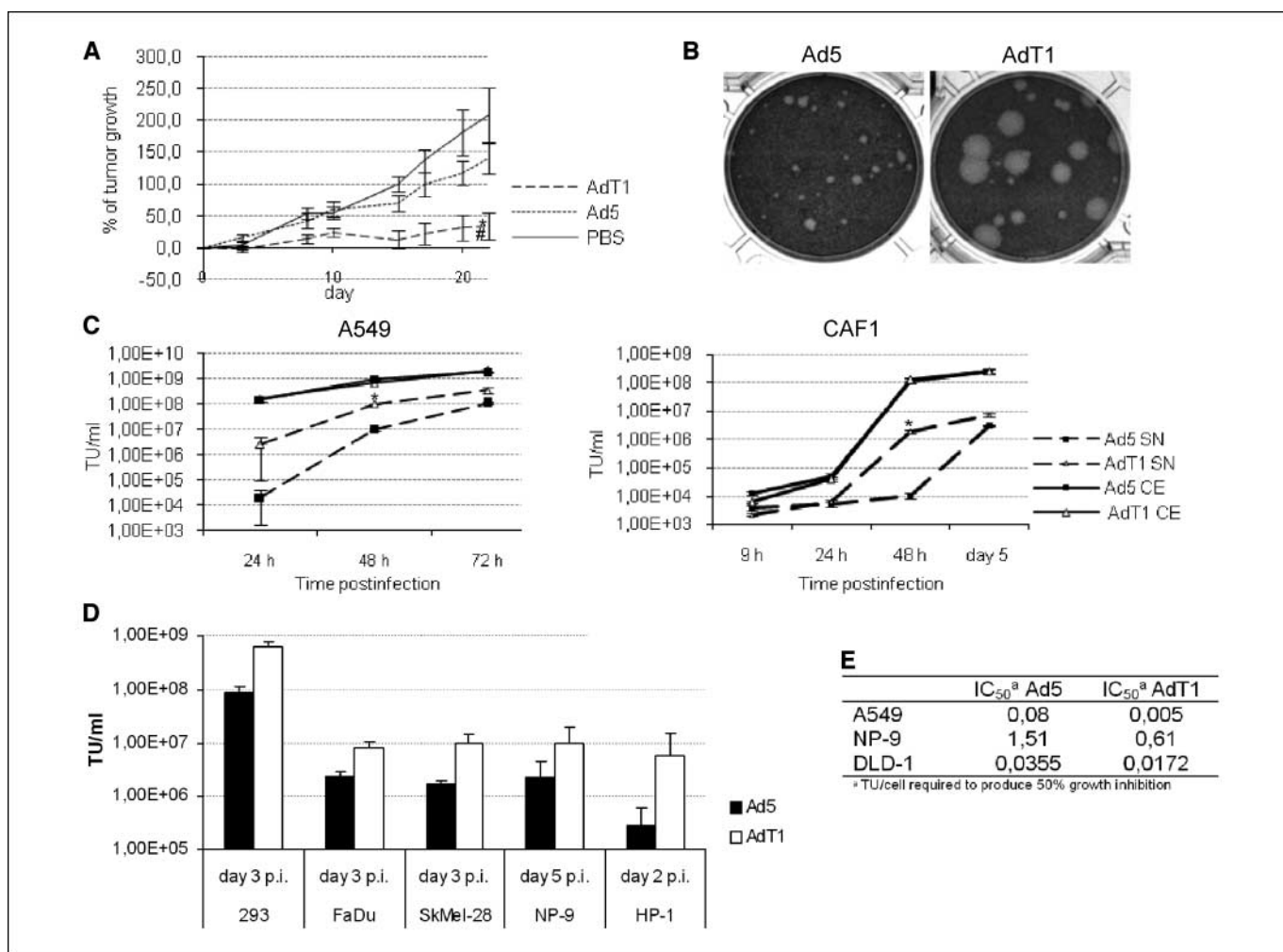


Figure 1. Characterization of the phenotype of AdT1. *A*, NP-9 tumor xenografts were treated i.v. with PBS, Ad5, or AdT1. Points, mean percentage of tumor growth ($n = 10$); bars, SE. #, significant ($P = 0.03$) compared with the group treated with PBS; *, significant ($P = 0.03$) compared with mice injected with Ad5. *B*, plaque size of Ad5 and AdT1 in A549 cells at day 7 postinfection. *C*, viral production and release kinetics of Ad5 and AdT1 in A549 cells (left) and carcinoma-associated fibroblasts (CAF1 cells; right). Extracellular (SN) and intracellular (CE) viral content were analyzed at the time points indicated. *, significant ($P = 8.9e-05$ and $P = 0.01$ for A549 and CAF1 cells, respectively) compared with Ad5. *D*, viral release of Ad5 and AdT1 in a panel of different tumor cell lines. Titer of the supernatant at the time point at which AdT1 and Ad5 showed biggest differences for each cell line. *E*, comparative cytotoxicity of Ad5 and AdT1 in A549, NP-9, and DLD-1 tumor cell lines.

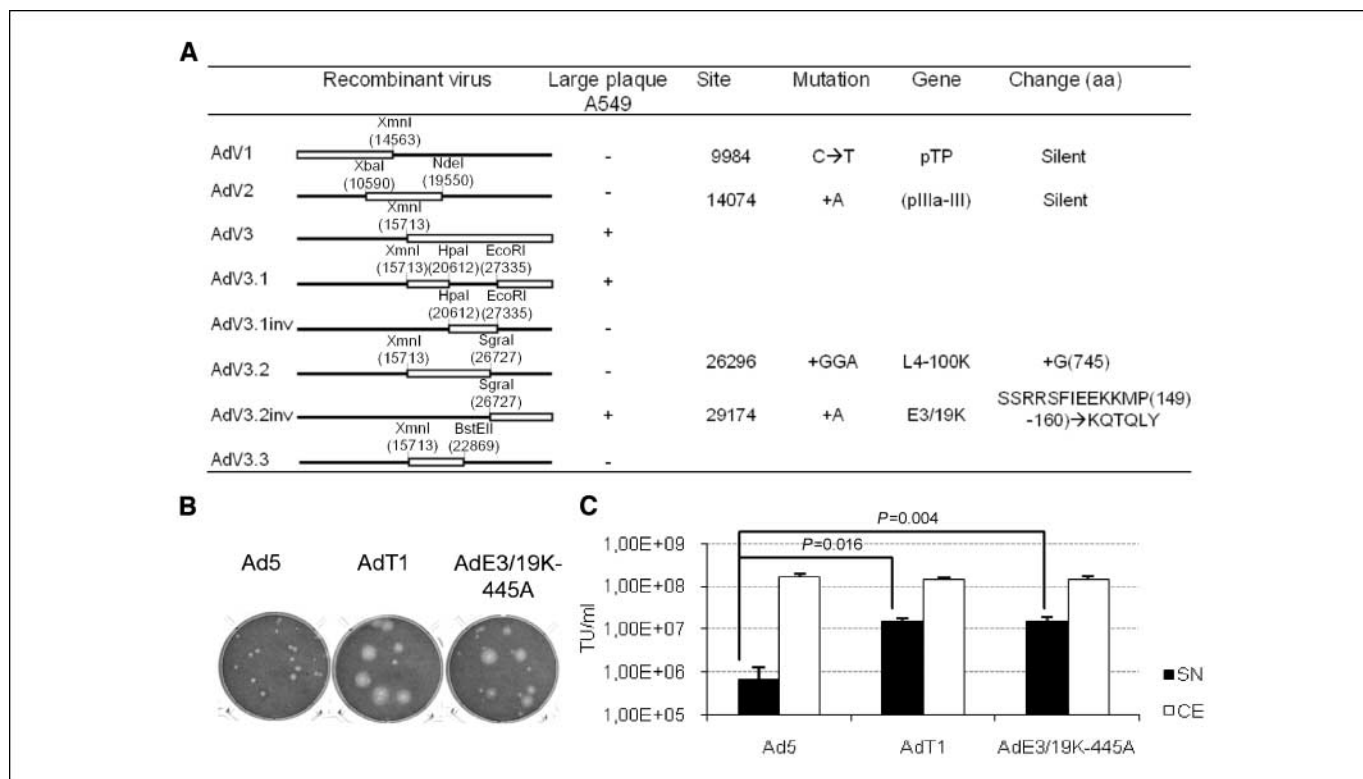


Figure 2. Identification of the mutations responsible for the AdT1 phenotype. *A*, schematic representation of the Ad5/AdT1 recombinants and the mutations present in the AdT1 genome. The fragments of the Ad5 (black) and AdT1 (white) genomes and the enzymes used for the construction of the recombinants are represented, as well as their ability to form large plaques in A549 monolayers. The site and genes affected by the mutations are specified. Nucleotide changes (→) and insertions (+) are indicated. Mutations located between two protein coding regions are indicated in parentheses. *pTP*, preterminal protein. The amino acid (aa) positions affected by the mutation are indicated in parentheses. *B*, plaque morphology of Ad5, AdT1 and AdE3/19K-445A in A549 cells 7 d after infection. *C*, viral release and production of Ad5, AdT1, and AdE3/19K-445A in carcinoma-associated fibroblasts. CAF1 cells were infected, and virus present in the supernatant (SN) and cell extract (CE) was measured 48 h postinfection.

enhanced cytotoxicity, as tested in A549, NP-9, and DLD-1 cells (Fig. 1E). The dominance of the phenotype of AdT1 was confirmed by performing a cell-plaque assay after coinfection with a GFP-expressing E1A-deleted adenoviral vector (Supplementary Fig. S1).

Identification of the mutation(s) responsible for the enhanced viral release of AdT1: E3/19K-445A mutation. We carried out the functional mapping of the AdT1 phenotype and complete sequence analysis of AdT1 genome. The Ad5/AdT1 recombinants mapped the mutation responsible for the large-plaque phenotype to nucleotides 27335 to 35935 of AdT1 (schematically represented in Fig. 2A). The sequence analysis of the genome revealed four mutations (Fig. 2A). Among these, two were silent and one inserted three nucleotides (GGA) in position 26296 of Ad5, which introduced an extra Gly at position 745 of the amino acid sequence of the L4-100K protein. The fourth mutation, found in position 29174, inserted an adenine into position 445 of the nucleotide sequence of the E3/19K protein. Because mutation E3/19K-445A was the only change detected in the smallest fragment of AdT1 that was able to confer large-plaque phenotype, we hypothesized it was responsible for the phenotype. The generation of mutant AdE3/19K-445A proved that this mutation was sufficient to enhance the release of Ad5. This mutation conferred both a large-plaque phenotype in A549 (Fig. 2B) and an enhanced viral release without modifying the viral yield in CAF1 cells (Fig. 2C). With these data, we concluded that

mutation E3/19K-445A was responsible for the enhanced release observed with AdT1.

The change in localization of the E3/19K protein enhances adenovirus release. E3/19K protein is a small glycoprotein coded by the early region E3 of Ad5. The cytoplasmic tail of this protein, affected by mutation E3/19K-445A, contains a dilysine motif essential for the retention of E3/19K in the endoplasmic reticulum (ER; refs. 25, 28). Mutation E3/19K-445A generates a shift in the open reading frame (ORF) that changes the amino acid sequence from position 149 and generates a stop codon at position 154. As a result, E3/19K-445A presents a truncated cytoplasmic tail, which results in the loss of the ER retention signal and is expected to relocate E3/19K to the plasma membrane.

The enhanced viral release observed with AdE3/19K-445A could be due to the loss of function of the E3/19K protein or to the gain of function of this protein when translocated to the cell surface. Two viruses were constructed to test this hypothesis: AdE3/19K-del, which lacks E3/19K expression (nucleotides 28846–29201 of Ad5 were deleted), and AdE3/19K-KS, a mutant different from AdE3/19K-445A which also affects the ER retention domain of this protein (the dilysine motif was substituted for two serines, KK→SS; ref. 29; Supplementary Table S1). As Fig. 3A displays, cell surface expression of the E3/19K was only detected in the cells infected with the viruses that had lost the ER retention signal: AdT1, AdE3/19K-445A, and AdE3/19K-KS. The lack of E3/19K expression in mutant AdE3/19K-del was confirmed by Western blot, as shown in

Fig. 3B. Interestingly, a viral release assay in CAF1 cells showed that AdE3/19K-KS was released 100 times more efficiently than Ad5 (Fig. 3C). The phenocopy of AdT1 and AdE3/19K-445A by AdE3/19K-KS established a direct association between the change of localization of E3/19K and the enhanced rate of viral release and suggested a new function for E3/19K at the cell membrane. By contrast, AdE3/19K-del showed levels of extracellular virus comparable with Ad5, in concordance with previous studies stating that the lack of E3/19K expression does not increase adenovirus release (30).

The enhanced release phenotype of mutant AdE3/19K-445A is not mediated by interaction with MHC-I at the cell surface or by apoptosis. The main function of E3/19K is to bind to and retain the heavy chains of MHC class I in the ER, preventing CTL response against adenoviral infection (25, 28, 31). Consequently, the loss of ER retention of E3/19K-445A inhibits ER retention of MHC-I. We hypothesized that the interaction of E3/19K and MHC-I at the plasma membrane could be triggering the enhanced release observed with AdE3/19K-445A. For this purpose, we constructed mutant AdE3/19K-445ACS40, which contained both the E3/19K-445A mutation and the substitution of a cysteine in position 40 of the amino acid sequence of E3/19K for a serine (C→S-40), which

prevents MHC-I binding (32). As Fig. 4A displays, the analysis of cell surface expression of MHC-I showed that AdE3/19K-445A blocked MHC-I transport to the plasma membrane less efficiently, although it did not reach basal levels of MHC-I expression, as previously described (33). On the other hand, mutant AdE3/19K-445ACS40 showed similar cell surface MHC-I expression as the uninfected cells. This confirms that this mutant is unable to prevent MHC-I transport to the membrane, because it is unable to bind to MHC-I (significant differences compared with AdE3/19K-445A). A viral release assay in CAF1 cells showed that, although AdE3/19K-445ACS40 was unable to bind to MHC-I, it was released earlier into the supernatant (Fig. 4B). This mutant also displayed a large-plaque phenotype in A549 (Supplementary Table S1), proving that the phenotype was not dependent on interaction with MHC-I. Additional evidence suggesting that the AdT1 mutant did not enhance viral release by interacting with MHC-I comes from the enhanced release phenotype of AdT1 in a cell line negative for MHC-I expression, such as DLD-1 (Fig. 1D and Supplementary Table S1).

Adenovirus mutants defective in viral genes that inhibit apoptosis produce a characteristic phenotype similar to that observed with AdT1 and AdE3/19K-445A (34). To determine the levels of apoptosis activation with our mutants, we analyzed PARP cleavage during the viral cycle. As Fig. 4C displays, the level of PARP cleavage in AdT1 and AdE3/19K-445A-infected cells was similar to that seen for Ad5, which shows that these mutants were unable to activate apoptosis. Further confirmation of the apoptosis independence of the AdE3/19K-445A phenotype was gained from viral release experiments in CAF1 cells treated with the broad spectrum caspase inhibitor Q-VD-OPh. Both the viral release and plaque-size of AdE3/19K-445A were not affected by the presence of Q-VD-OPh, proving that the enhanced rate of viral release was not mediated by apoptosis (Fig. 4D; Supplementary Table S1).

The enhanced release of E3/19K-445A-expressing mutants is not mediated by ADP overexpression. ADP is a small glycoprotein coded by the E3 region of Ad5 required for the efficient lysis of adenovirus-infected cells. Its overexpression results in an enhanced release and large-plaque phenotype (14, 30, 35). The expression of this protein is tightly regulated by pre-mRNA processing and some deletion mutations upstream of ADP which affect splicing or polyadenylation sites increase the expression of its early transcripts (26, 36). The proximity of E3/19K and ADP ORF led us to study a possible ADP overexpression caused by the E3/19K-445A mutation. No differences were found in the pattern of E3 transcripts (Supplementary Fig. S2A). Early ADP transcripts (bands *d* and *e*) were not detected 8 hours postinfection for neither Ad5 nor AdT1 but were greatly amplified 24 hours postinfection (bands *d'* and *e'*), as previously described (26). Western blot detection of ADP expression in the different mutants confirmed these results and dismissed ADP overexpression in AdT1 and AdE3/19K-445A-infected cells (Supplementary Fig. S2B). Furthermore, no differences in E1A nor adenovirus late protein expression were found for the different virus mutants (Supplementary Fig. S2B).

Mutant AdE3/19K-445A enhances cell permeability and increases intracellular $[Ca^{2+}]$. Some viruses actively enhance cell permeability during viral infection by the expression of viroporins, facilitating the influx of extracellular ions, which can enhance viral release through yet unknown mechanisms (37, 38). To study a putative viroporin-like function of E3/19K-445A, we analyzed cell permeability and intracellular Ca^{2+} concentration throughout the viral cycle. AdE3/19K-445A enhanced cell permeability at earlier

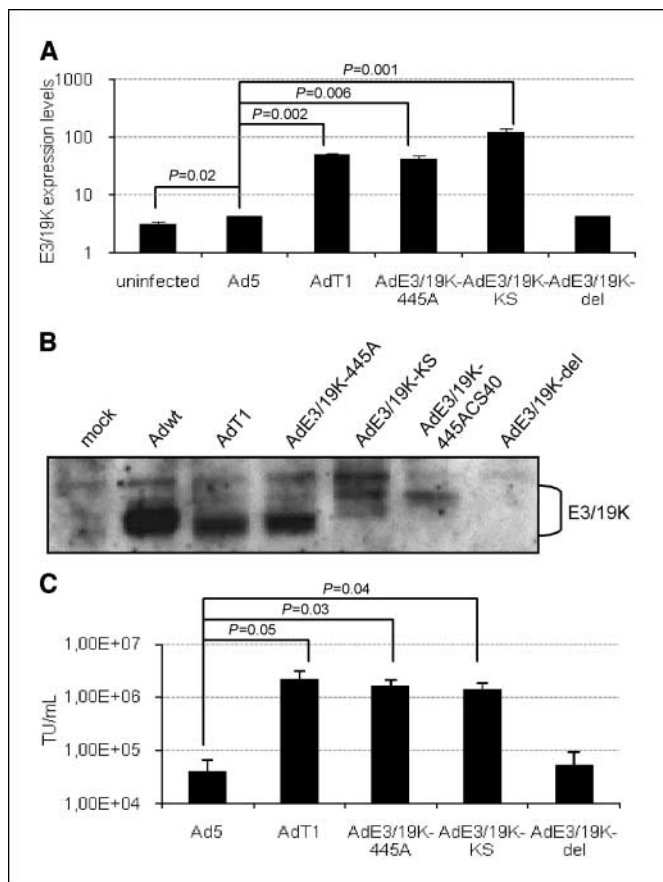


Figure 3. Association of E3/19K localization to the plasma membrane and the phenotype of enhanced release. **A**, cell surface expression of E3/19K protein in A549 cells. Expression of E3/19K in the plasma membrane was analyzed at 24 h postinfection in nonpermeabilized cells by flow cytometry with Tw1.3 antibody. **B**, Western blot detection of E3/19K. A549 cell lysates were processed for E3/19K protein expression 24 h postinfection with the adenovirus mutants indicated. **C**, viral release of Ad5, AdT1, AdE3/19K-445A, AdE3/19K-KS, and AdE3/19K-del in carcinoma-associated fibroblasts. Virus present in the supernatant was measured 48 h postinfection in CAF1.

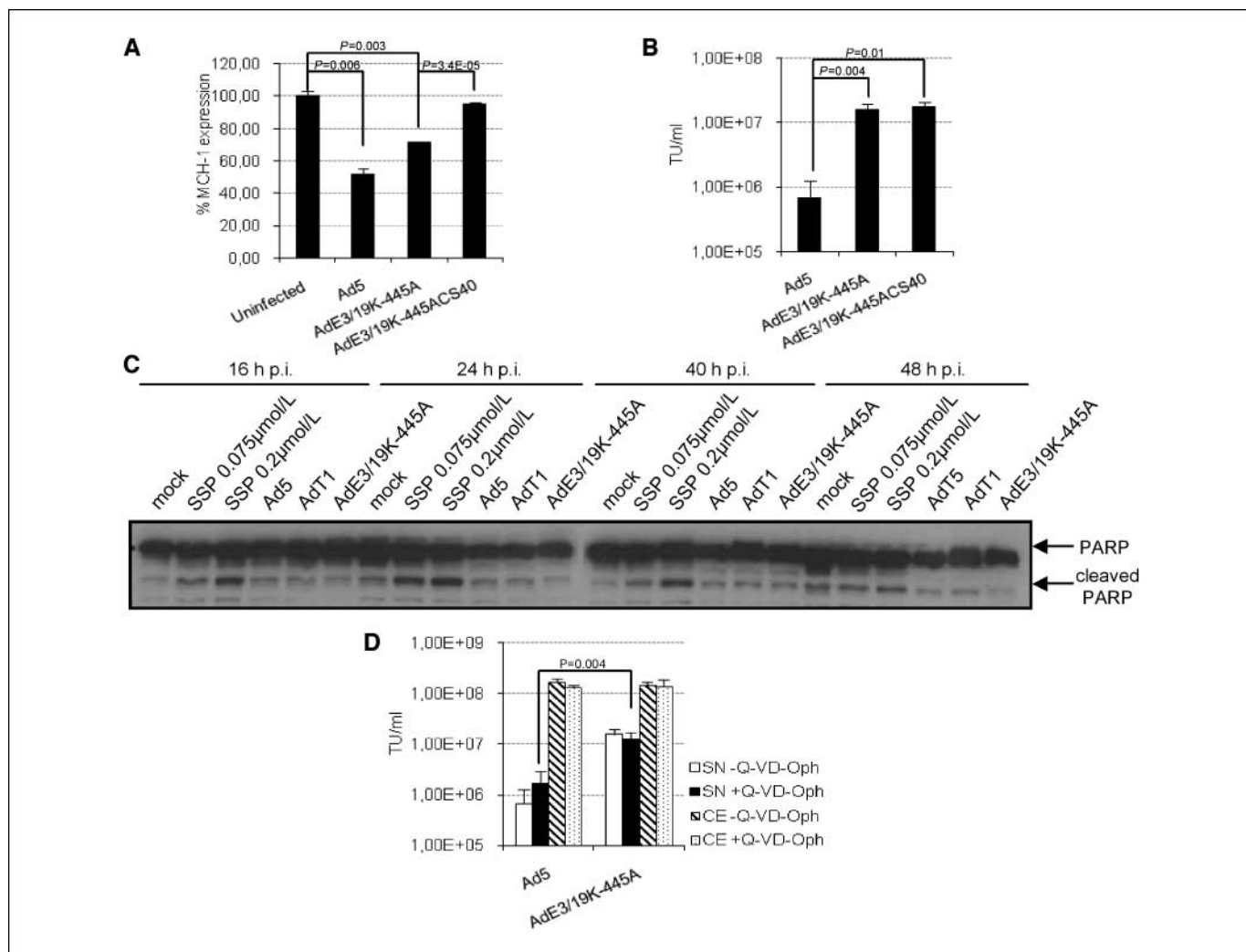


Figure 4. MHC-I binding and apoptosis independence of the enhanced release phenotype of AdT1. **A**, fluorescence-activated cell sorting analysis of MHC-I cell surface expression in mutant and Ad5-infected human A549 cells. Cells were infected and, 24 h later, exposed to the monoclonal antibody W6/32. Cell surface levels of class I antigens are expressed relative to that of mock-infected cells, which were set to 100%. **B**, viral release assay of Ad5, AdE3/19K-445A, and AdE3/19K-445ACS40 in carcinoma-associated fibroblasts. Cells were infected, and the virus present in the supernatant (SN) was measured 48 h postinfection. **C**, Western blot detection of PARP cleavage in mutant and Ad5-infected A549 cells. Mock-infected cells or infected with Ad5, AdT1, or AdE3/19K-445A or treated with 0.075 μmol/L and 0.2 μmol/L of staurosporine (SSP) as a positive control of apoptosis induction were analyzed. The cell lysates were processed for detection of PARP cleavage at 16, 24, 40, and 48 h postinfection. **D**, viral release and production of Ad5 and AdE3/19K-445A in carcinoma-associated fibroblasts in the presence of a broad spectrum apoptosis inhibitor, Q-VD-Oph. Cells were infected and incubated in the presence or absence of 20 μmol/L Q-VD-Oph. The extracellular (SN) and intracellular (CE) viral content was measured 48 h postinfection.

stages of infection (Fig. 5A), and this increase in cell permeability was associated with an increase in the intracellular Ca^{2+} concentration (Fig. 5B). This enhanced permeability for AdE3/19K-445A-infected cells was also observed in CAF1 (Fig. 5C). To test whether the influx of Ca^{2+} was the cause of the enhanced rate of viral release, we performed a viral release and production assay in CAF1 cells in the presence or absence of extracellular Ca^{2+} . Although the lack of Ca^{2+} in the extracellular medium affected the viral yield of both viruses, the differences in viral release between Ad5 and AdE3/19K-445A disappeared in the absence of Ca^{2+} (Fig. 5D), proving that the enhanced release of AdE3/19K-445A was triggered, at least in part, by Ca^{2+} influx.

Evaluation of *in vivo* efficacy. Mice carrying NP-9 pancreatic tumors were treated with a single i.v. dose of Ad5 or AdE3/19K-445A at 2×10^{10} vp/mouse. The enhanced antitumor activity shown by AdE3/19K-445A compared with Ad5 proves that the 445A

mutation is not only responsible for the enhanced release and cytotoxicity of AdT1 *in vitro* but also for the gain of oncolytic effect *in vivo* (Fig. 6A). In a second model, we assessed the comparative *in vivo* efficacy of Ad5, AdT1, and AdE3/19K-445A with a single intratumoral injection of virus into NP-9 s.c. tumors. Even in such conditions, in which we potentiate the amount of Ad5 in the tumor, both the AdT1 and AdE3/19K-445A-treated tumors responded better with respect to Ad5 (Fig. 6B). We also performed a third *in vivo* experiment in Syrian hamsters that has been described as an immunocompetent model wherein human adenovirus is able to replicate (Fig. 6C). Hamsters with s.c. pancreatic HP-1 tumors were treated intratumorally at a dose of 2.5×10^{10} vp/tumor. Both Ad5 and AdT1 displayed significant antitumoral activity, although no statistical significance among these groups was observed. Analysis of HP-1 tumor sections revealed that despite the presence of extensive areas of necrosis in all experimental groups, tumors

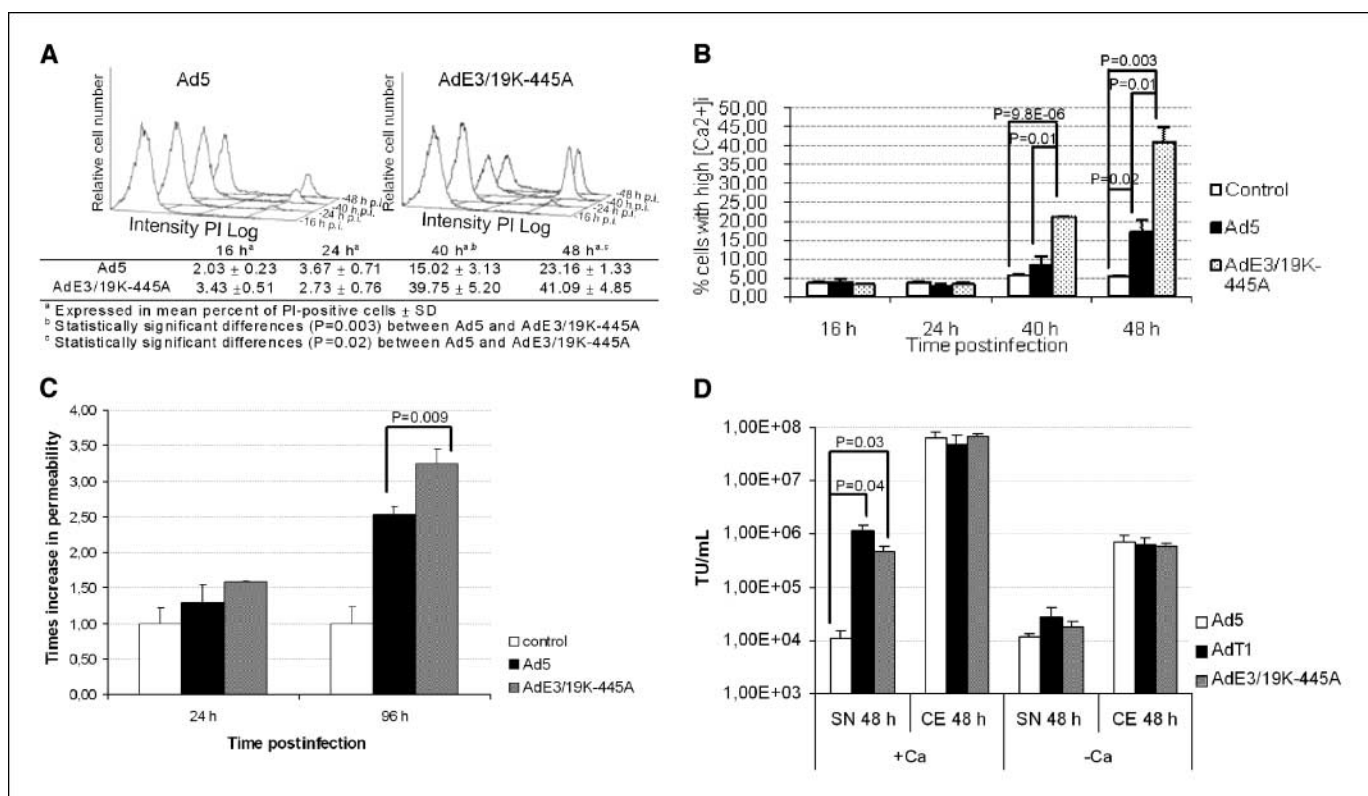


Figure 5. Adenovirus mutant AdE3/19K-445A enhances membrane permeabilization and increases intracellular Ca^{2+} concentration. **A**, kinetics of cell permeability of Ad5-infected and AdE3/19K-445A-infected A549 cells. Cells were infected and, at the indicated time points, trypsinized and incubated with PI. The number of permeable cells (PI-positive cells) was determined. The intensity of PI for infected cells is represented in a logarithmic scale. **B**, kinetics of cytosolic free Ca^{2+} during Ad5 and AdE3/19K-445A infection. A549 cells infected with Ad5 or AdE3/19K-445A were incubated at the indicated time points with Fluo-3 AM and Fura-red AM. The Fluo-3/Fura-red ratio for each cell was analyzed, and cells were divided into a population with a high ratio (high intracellular $[\text{Ca}^{2+}]$) or a low ratio (low intracellular $[\text{Ca}^{2+}]$). Percentage of cells with high intracellular calcium concentration is plotted for each time point. **C**, cell permeability of Ad5-infected and AdE3/19K-445A-infected CAF1 cells. **D**, viral release and production of Ad5, AdT1, and AdE3/19K-445A in the presence or absence of extracellular Ca^{2+} in carcinoma-associated fibroblasts. After infection, cells were incubated in normal or Ca^{2+} -free medium, and extracellular and intracellular viral contents were measured 48 h postinfection.

injected with AdT1 showed a more diffuse staining compared with Ad5, suggesting an improved spread of E3/19K-445A mutant virus (Fig. 6D).

Discussion

Improving the antitumor potency of current oncolytic adenoviruses represents one of the major challenges to obtain systemic therapeutic effect in clinical trials. Bioselection of randomly mutagenized pools of human Ad5 by repeated passaging under a predefined set of conditions is a classic virology strategy that has been recently postulated as a powerful method to develop more potent adenoviruses (18, 19). We hypothesized that the passage of Ad5 random mutants in an *in vivo* murine model of human tumors would provide a selective pressure environment closer to human tumors in the clinical setting, where the presence of a three-dimensional tumor stroma, the host immune system, and the proliferating status of tumor cells differ from those encountered in *in vitro* cell cultures.

By using this approach, we have isolated a new mutant virus, AdT1, which displays an enhanced antitumor activity when injected systemically in mice carrying s.c. human tumors. *In vitro* characterization revealed that AdT1 displays a large-plaque phenotype, which correlates with an increased cytotoxicity and release of viral progeny after replication, and a total viral yield not modified with respect to Ad5. Interestingly, the phenotype is not

restricted to the pancreatic tumors where the bioselection process was developed, but the increased progeny release is also evident in different tumor cell types, including melanoma, lung, head and neck, and colorectal adenocarcinomas. Previously described adenoviral mutants with large-plaque phenotype include mutants in E1B/19K, in which E1A-induced apoptosis is not blocked (39), and premature cell death may lead to a reduced viral production. On the other hand, mutants that overexpress the adenovirus death protein (14, 35) or that express COOH truncating forms of the i-leader protein (18, 19) also display large-plaque phenotype, improving viral release without affecting the total yield. A double strategy, including the generation of Ad5/AdT1 recombinants and complete genome sequencing, allowed us to conclude that the alteration responsible for the AdT1-phenotype was the insertion of one nucleotide in the E3/19K coding region (mutation E3/19K-445A), subsequently leading to the COOH truncation of the protein and loss of its ER retention signal. The E3/19K glycoprotein retains the class I MHC heavy chain in the ER (40, 41) and prevents tapasin processing of class I MHC-bound peptides (33). However, to date, it has never been postulated as capable of modifying viral cycle kinetics and its functions are assumed to be nonessential for adenovirus growth *in vitro* (42), which has led to its deletion in many oncolytic adenoviruses (2).

Our studies show that the translocation of E3/19K-445A to the plasma membrane is the determinant for the enhanced release phenotype of AdT1 and AdE3/19K-445A. Other mutants that also

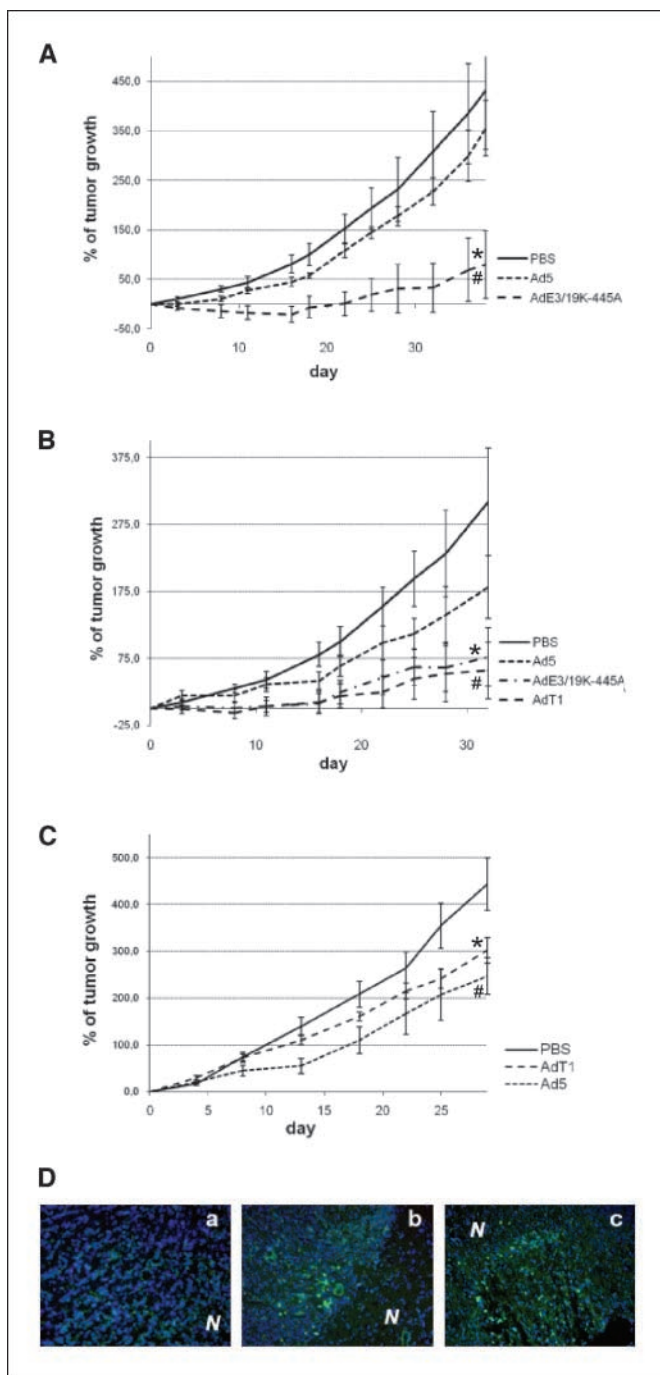


Figure 6. *In vivo* efficacy. **A**, NP-9 s.c. tumor xenografts were treated i.v. with PBS, Ad5, or AdE3/19K-445A. Points, mean percentage of tumor growth ($n = 10$); bars, SE. #, significant ($P = 0.03$) compared with the group treated with PBS; *, significant ($P = 0.008$) compared with mice injected with Ad5. **B**, NP-9 tumor xenografts were treated intratumorally with PBS, Ad5, AdT1, or AdE3/19K-445A. #, significant ($P = 0.003$) compared with tumors injected with PBS; *, significant ($P = 0.002$) compared with tumors injected with PBS. **C**, Syrian hamsters with s.c. HP-1 tumors were treated intratumorally with PBS, Ad5, or AdT1. Columns, mean percentage of tumor growth ($n = 10$); bars, SE. #, significant ($P = 0.01$) compared with tumors injected with PBS; *, significant ($P = 0.04$) compared with tumors injected with PBS. **D**, adenovirus intratumoral replication assessed by adenovirus detection in HP-1 pancreatic tumors grown s.c. in immunocompetent hamsters. Frozen sections of tumors obtained at day 29 after intratumoral injection of PBS (**a**), or 2.5×10^{10} vp of Ad5 (**b**) or AdT1 mutant (**c**) were treated with an anti-adenovirus antibody and counterstained with 4',6'-diamidino-2-phenylindole ($\times 200$). Sections taken from tumors treated with AdT1 displayed a more diffuse staining for adenovirus presence compared with Ad5-injected ones (green dots). N, necrotic areas.

induce a change of localization of E3/19K to the cell membrane by different genetic alterations, such as AdE3/19K-KS, also phenocopy the enhanced release of AdT1. This rules out the possibility that the precise E3/19K-445A alteration provokes a change in the complex splicing balance of the E3 region, leading to differential expression of ADP and enhanced cell death, as found with other E3 mutants (36). In fact, analysis of E3-specific mRNAs does not suggest any imbalance between the levels of the different transcripts after AdT1 infection with respect to Ad5. Furthermore, protein levels of ADP, E1A, and major structural proteins are not modified in E3/19K-445A containing adenoviruses. Overall, these data suggest that the viral cycle of AdT1 is only affected in its latest events, i.e., the plasma membrane permeabilization and the mutant virion release.

How E3/19K-445A relocation improves adenovirus release is not clear at the present. This function is not related to the ability of E3/19K to bind MHC-I, its canonical target, but the presence of the mutation confers the protein the ability to initiate a new pathway. Apoptosis induction seems not to be the basis of the enhanced spreading of the E3/19K-445A mutants, as is the case for other large-plaque mutant adenoviruses (39). Interestingly, our results provide evidence that infection with E3/19K-445A expressing adenoviruses disrupts intracellular Ca^{2+} gradients maintained by the plasma and ER membranes, leading to an increase in the cytoplasmic calcium levels. Furthermore, the requirement for extracellular Ca^{2+} availability for the enhanced release phenotype of AdT1 suggests that such increases in intracellular calcium are due, at least in part, to the influx of extracellular calcium. Increases in intracellular calcium have been shown to be involved in animal virus-induced cytopathic effects and cell killing (43). Protein 2B from coxsackievirus, a protein with viroporin function, gradually induces the influx of extracellular Ca^{2+} , and release of Ca^{2+} from ER stores to permeabilize the plasma membrane and ultimately cause membrane lesions that allow the release of virus progeny (38). Interestingly, wild-type E3/19K is capable of mobilizing the ER pool of Ca^{2+} through an indirect mechanism (29). Although a direct role in Ca^{2+} mobilization by E3/19K-445A warrants experiments with the protein being autonomously expressed, we hypothesize that the mutant E3/19K acts functionally as a viroporin. Viroporins are nonessential, virally encoded, small membrane proteins that form selective channels in membranes, allowing the diffusion of ions and small molecules. Their deletion affects mainly the assembly and exit of virions (37). Their functions are related to both the modification of cell permeability to ions and membrane destabilization. The use of viroporins to promote progeny release is common to several families of viruses, such as picornavirus (38, 44), retrovirus (45), and orthomyxoviruses (46). In this context, our results suggest that, as a consequence of the selective pressure exerted in human xenografted tumors *in vivo*, adenovirus has evolved to incorporate an alternative and more efficient mechanism of release, which it lacks in its native form (where it uses ADP as the main mechanism), but that other animal viruses have previously selected. Moreover, the fact that the mutation selected in the current adenovirus bioselection process affects one of the main limitations found in oncolytic viruses suggests that pressure encountered in the environment of human tumors *in vivo* may be particularly relevant. Curiously, the latter stages in the viral cycle seem to be more prone to optimization within the tumor milieu. Further insight into the mechanism of release of E3/19K-COOH terminal truncated mutants could provide additional clues to understand the poorly characterized mechanism of release of native adenovirus modulation.

In terms of the immune response modulation, the E3/19K-445A form differs from its wild-type counterpart in its ability to bind and retain MHC class I molecules, but it is expected to retain the tapasin inhibition ability that wild-type E3/19K possesses. Mutants with truncated COOH terminal forms of the protein showed the ability to delay by 10-fold the maturation of class I molecules because they are still able to interact with TAP and interfere with tapasin function (33), and T1 mutants should behave similarly. More recently, it has been reported that E3/19K is additionally involved in evasion of natural killer (NK) cell recognition through its ability to interact with MHC-I chain-related proteins A and B (47). Although such function is impaired for E3/19K-445A protein, enhanced antitumoral activity of AdE3/19K-445A mutants obtained in different *in vivo* models in mice, where NK function is present, suggest that the lack of such function can be efficiently bypassed, at least in the particular environment associated to tumors. Further experiments in more immunocompetent models are necessary to establish the exact immunologic implications associated with the presence of the 445A mutation.

Transcription of E3 proteins is mainly regulated by E1A expression through ATF and AP-1 boxes within the E3 promoter (48), implying that the enhanced release phenotype associated with the expression of the mutant version of E3/19K is restricted to cells where E1A activation is permitted. We are currently generating conditional replicating adenoviruses that include the E3/19K-445A protein in the backbone of tumor promoter-driven E1A-regulated adenoviruses, such as ICOVIR-5 (11, 49), with the aim of increasing its ability to spread intratumorally. Interestingly, the increase in progeny release of AdT1 and AdE3/19K-445A mutants is specially noted in cancer-associated fibroblasts, a perpetually activated

fibroblast population within desmoplastic lesions that are associated with malignant tumors (50). The release of E3/19K-445A mutant progeny occurs 3 days earlier with respect to that of Ad5 in the same cell population. Tumor stroma, composed of the extracellular matrix and mesenchymal cells, has been considered as a barrier to the efficient intratumoral diffusion of viruses (11, 12). Although the ability of oncolytic viruses to replicate in tumor-associated fibroblasts will depend on the selectivity mechanism in which the virus is based, the proliferative status of such fibroblasts (51) should allow efficient replication of pRB-dependent adenoviruses and the inclusion of E3/19K-445A mutation in ICOVIR-5 would provide the virus the ability to bypass fibroblast-mediated barriers.

Disclosure of Potential Conflicts of Interest

No potential conflicts of interest were disclosed.

Acknowledgments

Received 3/26/2008; revised 7/25/2008; accepted 8/25/2008.

Grant support: Mutua Madrileña Medical Research Foundation (Spain), Departament d'Universitats, Recerca i Societat de la Informació from Generalitat de Catalunya grant 2005 SGR 00727, and European Union 6th framework project research contract 18700 (Therapox; R. Alemany). R. Alemany belongs to the Network of Cooperative Research on Cancer (C03-10), Instituto de Salud Carlos III of the Ministerio de Sanidad y Consumo, Government of Spain.

The costs of publication of this article were defrayed in part by the payment of page charges. This article must therefore be hereby marked *advertisement* in accordance with 18 U.S.C. Section 1734 solely to indicate this fact.

We thank Eduard Serra, Blanca Luena for her technical assistance in animal experiments, Dr. J.W. Yewdell (Laboratory of Viral Diseases, NIAID, NIH) and Dr. W.S.M. Wold (St. Louis University) for providing Tw1.3. and anti-ADP antibodies, respectively, and Lynda Coughlan for the extensive revision of this manuscript.

References

- Liu TC, Galanis E, Kirn D. Clinical trial results with oncolytic virotherapy: a century of promise, a decade of progress. *Nat Clin Pract Oncol* 2007;4:101-17.
- Alemany R. Cancer selective adenoviruses. *Mol Aspects Med* 2007;28:42-58.
- Aghi M, Martuza RL. Oncolytic viral therapies - the clinical experience. *Oncogene* 2005;24:7802-16.
- Chu RL, Post DE, Khuri FR, Van Meir EG. Use of replicating oncolytic adenoviruses in combination therapy for cancer. *Clin Cancer Res* 2004;10:5299-312.
- Hamid O, Varterasian ML, Wadler S, et al. Phase II trial of intravenous CI-1042 in patients with metastatic colorectal cancer. *J Clin Oncol* 2003;21:1498-504.
- Small EJ, Carducci MA, Burke JM, et al. A phase I trial of intravenous CG7870, a replication-selective, prostate-specific antigen-targeted oncolytic adenovirus, for the treatment of hormone-refractory, metastatic prostate cancer. *Mol Ther* 2006;14:107-17.
- Alemany R, Suzuki K, Curiel DT. Blood clearance rates of adenovirus type 5 in mice. *J Gen Virol* 2000;81:2605-9.
- Bernt KM, Ni S, Gaggari A, et al. The effect of sequestration by nontarget tissues on anti-tumor efficacy of systemically applied, conditionally replicating adenovirus vectors. *Mol Ther* 2003;8:746-55.
- Muruve DA. The innate immune response to adenovirus vectors. *Hum Gene Ther* 2004;15:1157-66.
- Wilson JM. Adenoviruses as gene-delivery vehicles. *N Engl J Med* 1996;334:1185-7.
- Cascallo M, Alonso MM, Rojas JJ, et al. Systemic toxicity-efficacy profile of ICOVIR-5, a potent and selective oncolytic adenovirus based on the pRB pathway. *Mol Ther* 2007;15:1607-15.
- Sauthoff H, Hu J, Maca C, et al. Intratumoral spread of wild-type adenovirus is limited after local injection of human xenograft tumors: virus persists and spreads systemically at late time points. *Hum Gene Ther* 2003;14:425-33.
- Wein LM, Wu JT, Kirn DH. Validation and analysis of a mathematical model of a replication-competent oncolytic virus for cancer treatment: implications for virus design and delivery. *Cancer Res* 2003;63:1317-24.
- Doronin K, Toth K, Kuppaswamy M, et al. Tumor-specific, replication-competent adenovirus vectors overexpressing the adenovirus death protein. *J Virol* 2000;74:6147-55.
- van Beusechem VW, van den Doel PB, Grill J, Pinedo HM, Gerritsen WR. Conditionally replicative adenovirus expressing p53 exhibits enhanced oncolytic potency. *Cancer Res* 2002;62:6165-71.
- Wildner O, Blaese RM, Morris JC. Therapy of colon cancer with oncolytic adenovirus is enhanced by the addition of herpes simplex virus-thymidine kinase. *Cancer Res* 1999;59:410-3.
- Bristol JA, Zhu M, Ji H, et al. *In vitro* and *in vivo* activities of an oncolytic adenovirus vector designed to express GM-CSF. *Mol Ther* 2003;7:755-64.
- Yan W, Kitzes G, Dormishian F, et al. Developing novel oncolytic adenoviruses through bioselection. *J Virol* 2003;77:2640-50.
- Subramanian T, Vijayalingam S, Chinnadurai G. Genetic identification of adenovirus type 5 genes that influence viral spread. *J Virol* 2006;80:2000-12.
- Villanueva A, Garcia C, Paules AB, et al. Disruption of the antiproliferative TGF- β signaling pathways in human pancreatic cancer cells. *Oncogene* 1998;17:1969-78.
- Batra SK, Metzgar RS, Worlock AJ, Hollingsworth MA. Expression of the human MUC1 mucin cDNA in a hamster pancreatic tumor cell line HP-1. *Int J Pancreatol* 1992;12:271-83.
- Alemany R, Curiel DT. CAR-binding ablation does not change biodistribution and toxicity of adenoviral vectors. *Gene Ther* 2001;8:1347-53.
- Williams JF, Gharpure M, Ustacelebi S, McDonald S. Isolation of temperature-sensitive mutants of adenovirus type 5. *J Gen Virol* 1971;11:95-101.
- Cascallo M, Gros A, Bayo N, et al. Deletion of VAI and VAIL RNA genes in the design of oncolytic adenoviruses. *Hum Gene Ther* 2006;17:929-40.
- Cox JH, Bennink JR, Yewdell JW. Retention of adenovirus E19 glycoprotein in the endoplasmic reticulum is essential to its ability to block antigen presentation. *J Exp Med* 1991;174:1629-37.
- Tollefson AE, Scaria A, Saha SK, Wold WS. The 11,600-MW protein encoded by region E3 of adenovirus is expressed early but is greatly amplified at late stages of infection. *J Virol* 1992;66:3633-42.
- Burchiel SW, Edwards BS, Kuckuck FW, et al. Analysis of free intracellular calcium by flow cytometry: multiparameter and pharmacologic applications. *Methods* 2000;21:221-30.
- Jackson MR, Nilsson T, Peterson PA. Retrieval of transmembrane proteins to the endoplasmic reticulum. *J Cell Biol* 1993;121:317-33.
- Pahl HL, Sester M, Burgert HG, Baeuerle PA. Activation of transcription factor NF- κ B by the adenovirus E3/19K protein requires its ER retention. *J Cell Biol* 1996;132:511-22.
- Tollefson AE, Ryerse JS, Scaria A, Hermiston TW, Wold WS. The E3-11.6-kDa adenovirus death protein (ADP) is required for efficient cell death: characterization of cells infected with adp mutants. *Virology* 1996;220:152-62.
- Hermiston TW, Tripp RA, Sparer T, Gooding LR, Wold WS. Deletion mutation analysis of the adenovirus type 2 E3-19K protein: identification of sequences within the endoplasmic reticulum luminal domain that are required for class I antigen binding and protection from adenovirus-specific cytotoxic T lymphocytes. *J Virol* 1993;67:5289-98.
- Sester M, Burgert HG. Conserved cysteine residues within the E3/19K protein of adenovirus type 2 are

- essential for binding to major histocompatibility complex antigens. *J Virol* 1994;68:5423–32.
33. Bennett EM, Bennink JR, Yewdell JW, Brodsky FM. Cutting edge: adenovirus E19 has two mechanisms for affecting class I MHC expression. *J Immunol* 1999;162:5049–52.
34. White E, Grodzicker T, Stillman BW. Mutations in the gene encoding the adenovirus early region 1B 19,000-molecular-weight tumor antigen cause the degradation of chromosomal DNA. *J Virol* 1984;52:410–9.
35. Tollefson AE, Scaria A, Ying B, Wold WS. Mutations within the ADP (E3-11.6K) protein alter processing and localization of ADP and the kinetics of cell lysis of adenovirus-infected cells. *J Virol* 2003;77:7764–78.
36. Scaria A, Wold WS. Fine-mapping of sequences that suppress splicing in the E3 complex transcription unit of adenovirus. *Virology* 1994;205:406–16.
37. Gonzalez ME, Carrasco L. Viroporins. *FEBS Lett* 2003;552:28–34.
38. van Kuppeveld FJ, Hoenderop JG, Smeets RL, et al. Coxsackievirus protein 2B modifies endoplasmic reticulum membrane and plasma membrane permeability and facilitates virus release. *EMBO J* 1997;16:3519–32.
39. Pilder S, Logan J, Shenk T. Deletion of the gene encoding the adenovirus 5 early region 1b 21,000-molecular-weight polypeptide leads to degradation of viral and host cell DNA. *J Virol* 1984;52:664–71.
40. Andersson M, Paabo S, Nilsson T, Peterson PA. Impaired intracellular transport of class I MHC antigens as a possible means for adenoviruses to evade immune surveillance. *Cell* 1985;43:215–22.
41. Burgert HG, Kvist S. An adenovirus type 2 glycoprotein blocks cell surface expression of human histocompatibility class I antigens. *Cell* 1985;41:987–97.
42. Bhat BM, Wold WS. A small deletion distant from a splice or polyadenylation site dramatically alters pre-mRNA processing in region E3 of adenovirus. *J Virol* 1987;61:3938–45.
43. Chami M, Oules B, Paterlini-Brechot P. Cytobiological consequences of calcium-signaling alterations induced by human viral proteins. *Biochim Biophys Acta* 2006;1763:1344–62.
44. de Jong AS, Schrama IW, Willems PH, et al. Multimerization reactions of coxsackievirus proteins 2B, 2C and 2BC: a mammalian two-hybrid analysis. *J Gen Virol* 2002;83:783–93.
45. Gonzalez ME, Carrasco L. The human immunodeficiency virus type 1 Vpu protein enhances membrane permeability. *Biochemistry* 1998;37:13710–9.
46. Guinea R, Carrasco L. Influenza virus M2 protein modifies membrane permeability in *E. coli* cells. *FEBS Lett* 1994;343:242–6.
47. McSharry BP, Burgert HG, Owen DP, et al. Adenovirus E3/19K promotes evasion of NK cell recognition by intracellular sequestration of the NKG2D ligands major histocompatibility complex class I chain-related proteins A and B. *J Virol* 2008;82:4585–94.
48. Akusjarvi G. Proteins with transcription regulatory properties encoded by human adenoviruses. *Trends Microbiol* 1993;1:163–70.
49. Alonso MM, Cascallo M, Gomez-Manzano C, et al. ICOVIR-5 shows E2F1 addiction and potent antiangioma effect *in vivo*. *Cancer Res* 2007;67:8255–63.
50. Kalluri R, Zeisberg M. Fibroblasts in cancer. *Nat Rev Cancer* 2006;6:392–401.
51. Hasebe T, Sasaki S, Imoto S, Ochiai A. Proliferative activity of intratumoral fibroblasts is closely correlated with lymph node and distant organ metastases of invasive ductal carcinoma of the breast. *Am J Pathol* 2000;156:1701–10.

A modified E2F-1 promoter improves the efficacy to toxicity ratio of oncolytic adenoviruses

JJ Rojas, M Cascallo, S Guedan, A Gros, J Martinez-Quintanilla, A Hemminki and R Alemany
Gene Therapy 2009 Dec;16(12):1441-51

ORIGINAL ARTICLE

A modified E2F-1 promoter improves the efficacy to toxicity ratio of oncolytic adenoviruses

JJ Rojas¹, M Cascallo¹, S Guedan¹, A Gros¹, J Martinez-Quintanilla¹, A Hemminki² and R Alemany¹

¹Translational Research Laboratory, IDIBELL-Institut Català d'Oncologia, L'Hospitalet de Llobregat, Barcelona, Spain and ²Cancer Gene Therapy Group, Molecular Cancer Biology Program, Transplantation Laboratory, Haartman Institute, Finnish Institute for Molecular Medicine, University of Helsinki, and HUSLAB, Helsinki University Central Hospital, Helsinki, Finland

The E2F-1 promoter has been used to confer tumor-selective E1A expression in oncolytic adenoviruses. Tumor specificity is mainly conferred by a unique structure of E2F-responsive sites organized in palindromes. Binding of the E2F-pRb complex to these palindromes results in repression of transcription in normal cells. Owing to deregulation of the Rb/p16 pathway in tumor cells, binding of free E2F activates transcription and initiates an auto-activation loop involving E1A and E4-6/7. ICOVIR-7 is a new oncolytic adenovirus designed to increase the E2F dependency of E1A gene expression. It incorporates additional palindromes of E2F-responsive sites in an insulated E2F-1 promoter controlling E1A- Δ 24. The E2F palindromes

inhibited replication in normal cells, resulting in a low systemic toxicity at high doses in immunocompetent mice. The Δ 24 deletion avoids a loop of E2F-mediated self-activation in nontumor cells. Importantly, the additional E2F-binding hairpins boost the positive feedback loop on the basis of E1A-mediated transcriptional regulation of E4-6/7 turned on in cancer cells and increased antitumor potency as shown in murine subcutaneous xenograft models treated by intravenous injection. These results suggest that the unique genetic combination featured in ICOVIR-7 may be promising for treating disseminated neoplasias.

Gene Therapy advance online publication, 27 August 2009; doi:10.1038/gt.2009.103

Keywords: oncolytic adenovirus; E1A; E2F-1 promoter; E2F-binding sites; Rb pathway

Introduction

Genetic engineering techniques and a better understanding of the interactions between viruses and cells result in an improved design of tumor-selective adenoviruses for cancer treatment.¹ Among the modifications introduced into oncolytic adenoviruses to confer tumor selectivity, promoters for E1A transcription control are essential if systemic use is desired, as they can prevent E1A expression in nontarget tissues. In this regard, tissue-specific promoters have been tested to target cancers arising from specific tissues.^{2,3} However, promoters active in a wider range of tumor types increase the patient population potentially benefiting from a new treatment agent. A tight and potent promoter regulated by repression in normal cells and activation in tumor cells might be an ideal option for reaching a high antitumor effect with low toxicity.

Deregulation of the retinoblastoma (Rb/p16) pathway is a hallmark of cancer cells.⁴ Aberrations of this pathway lead to the release of E2F transcription factors for the activation of the E2F site containing promoters. Most E2F-responsive genes are involved in the control of cell cycle or in DNA synthesis and its activation leads to an S-phase entry. It is interesting that silencing of these

promoters is also carried out by the same E2F-binding sites in quiescent cells, when E2F is bound to pRb. The formation of a complex involving E2F-pRb and histone deacetylase represses transcription by binding to E2F sites.⁵ One of the promoters controlled by E2F is the E2F-1 promoter. It is subject to a strict activation loop of transcription because of its unique roles in apoptosis and DNA repair.⁶ Transcriptional control of this promoter depends on a unique structure consisting in four E2F-binding sites organized as two imperfect palindromes.^{7,8} Importantly, a similar palindromic pattern controls the expression of the E2a promoter of adenovirus type 5,⁹ suggesting the optimal structure of this arrangement in terms of DNA length to confer E2F responsiveness.

S-phase induction is a requisite for adenoviral life cycle. Therefore, adenoviruses have evolved two different mechanisms to induce an expression of the E2F-1 gene. First, the E1A protein displaces pRb from the E2F-pRb complex to release E2F and activate E2F-1 and viral promoters.¹⁰ Second, the E4-6/7 protein complements this function by binding to free E2F and forming a complex that induces the cooperative and stable binding of E2F to the inverted binding sites present in the E2F-1 and E2a promoter.¹¹ Disruption of the Rb pathway in tumor cells can functionally substitute E1A-mediated E2F release and, therefore, selective replication in tumor cells can be achieved by deleting the pRb-binding site of E1A. This has been used in Δ 24 and Δ 1922–947 oncolytic adenoviruses.^{12,13} However, a constitutive expression of mutated E1A protein in every infected cell causes high

Correspondence: Dr R Alemany, Translational Research Laboratory, Institut Català d'Oncologia-IDIBELL, Av Gran Via S/N Km2,7, L'Hospitalet de Llobregat, Barcelona 8907, Spain.

E-mail: ralemany@iconcologia.net

Received 1 April 2009; revised 23 July 2009; accepted 27 July 2009

toxicity by itself and compromises the systemic administration of these viruses for treatment of disseminated cancer. With the aim of overcoming this limitation, the E2F-1 promoter has been used to control E1A transcription because of its E2F addiction.¹⁴ In normal cells, binding of the E2F-pRb complex to the promoter restricts E1A transcription and the viral life cycle is aborted. In cancer cells, E1A transcription is activated by free E2F and a loop of autoactivation is triggered by E1A and E4-6/7, leading to the replication of the virus and lysis of cancer cells.

In this study, we modify the E2F-1 promoter to increase the dependency of virus replication on free E2F. Our group has previously described ICOVIR-5, an oncolytic adenovirus controlling selective replication at different levels: transduction (integrin-mediated adenoviral infection), transcription (insulated E2F-1 promoter, which contains two palindromic E2F-responsive sites, controlling E1A), optimized ribosome recognition (Kozak sequence) and protein-protein interaction (E1A-Δ24 unable to bind pRb). ICOVIR-5 has shown a potent antiglioma effect alone¹⁵ or in combination with chemotherapy¹⁶ and antitumor efficacy in a wide range of subcutaneous tumor models after systemic administration with a low toxicity profile.¹⁷ In this study, we improved the transcriptional control of E1A using an E2F-1 promoter modified by the insertion of four extra E2F-palindrome sites. Viral replication is improved in cancer cells and an important enhancement of antitumoral potency *in vivo* is achieved in all cancer models tested. Importantly, replication in normal cells and toxicity in mice are not compromised by this promoter modification. These results are potentially applicable to improve the selectivity and potency of other oncolytic adenoviruses currently based on promoters controlled by E2F transcription factors or even on promoters without E2F sites.

Results

ICOVIR-7 replication is restricted in normal cells

The palindromic E2F-binding sites located between positions -36 and -6 of the E2F-1 promoter confer the potency and selectivity of this promoter.^{7,8} ICOVIR-5 is an oncolytic adenovirus controlling E1A-Δ24 transcription under the E2F-1 promoter.¹⁵⁻¹⁷ To enhance the dual role of E2F on transcription control, an E2F-responsive promoter was constructed by inserting four new E2F-responsive palindromes into the E2F-1 promoter. ICOVIR-7 is a novel oncolytic adenovirus designed to increase selective replication in tumor cells by placing this modified E2F-responsive promoter to control E1A-Δ24 transcription. As E1A expression determines toxicity,¹⁸ a stricter control of E1A transcription may allow the systemic administration of oncolytic adenoviruses for the treatment of disseminated neoplasias. Figure 1a represents how genetic modifications of ICOVIR-7 work together to abrogate replication in normal cells.

Treatment of disseminated cancer requires a systemic injection of the oncolytic agent. As a large proportion of the virus administered systemically ends up in the liver, analysis of virus replication in precision-cut human liver slices is an important tool for estimating liver toxicity.¹⁹ Liver biopsy samples were infected and cell extracts

were titrated at day 6 after infection. We reached a complete inhibition of replication with ICOVIR-7, detecting the same progeny production as with the nonreplicative negative control AdTL-RGD (Figure 1b). Replication inhibition with ICOVIR-5 was also complete. Another tissue type relevant in adenoviral toxicity is endothelium. Vascular endothelium injury is reported to be a prominent abnormality after a high-dose injection of adenovirus.²⁰ Human umbilical vein endothelial cells (HUVECs) were infected and replication after 4 days was analyzed. It was of interest that ICOVIR-7 replicated almost sevenfold less than AdwtRGD and was even more selective than ICOVIR-5, reducing by twofold the replication of this previous version (Figure 1c, $P < 0.05$).

Hepatic and hematological toxicity after systemic ICOVIR-7 administration in vivo

To assess *in vivo* systemic toxicity after ICOVIR-7 administration, immunocompetent mice were injected with increasing doses of ICOVIR-7 or control viruses by a single intravenous injection. Animals were weighed daily and liver enzymes (AST and ALT) and hematological parameters were determined at day 5 after injection. For positive control AdwtRGD, samples were collected at day 3 after injection because of much higher toxicity. No casualties were observed after administration of ICOVIRs.

Transaminase elevation is an indicator of liver injury after systemic administration of adenoviruses,²¹ and it has been reported after a high-dose injection of oncolytic adenovirus in clinical trials.^{22,23} A dose of 5×10^{10} viral particles of AdwtRGD caused up to an 80-fold elevation of both AST and ALT compared with non-treated animals (Figure 2a). In contrast, the injection of the same dose of ICOVIR-7 did not increase transaminase levels significantly. Even at a higher dose of ICOVIR-7 (1×10^{11} viral particles per mouse), only a slight increase in transaminase levels was observed. Hematological alterations are also frequently observed after systemic administration of large doses of adenoviruses.^{20,23,24} We observed significant thrombocytopenia and lymphopenia after AdwtRGD injection, but not after ICOVIR-7 (Figures 2b and c). In addition, although intravenous AdwtRGD at 5×10^{10} viral particles decreased the body weight of mice significantly, indicating high toxicity, ICOVIR-7 at the same dose did not differ from phosphate-buffered saline (PBS) in this regard (Figure 2d). A dose of 1×10^{11} viral particles of ICOVIR-5 or ICOVIR-7 per mouse slightly reduced the body weight of mice.

Owing to the inability of human adenoviruses to productively replicate in mouse cells, the main toxicity in murine livers is associated with E1A expression.¹⁸ Strong immunostaining was detected throughout livers from AdwtRGD-treated mice. In contrast, even at the highest dose of ICOVIR-7 (1×10^{11} viral particles per mouse), little E1A was detected, indicating that the E2F-responsive promoter effectively restricts the expression of E1A in liver (Figure 3a). A histological analysis of livers from animals treated with AdwtRGD revealed evident symptoms of degenerative cirrhosis (macrosteatosis, presence of Councilman bodies and large necrotic areas), symptoms that were absent in livers from ICOVIR-7-treated animals (Figure 3b). Importantly, the *in vivo* toxicity profile of ICOVIR-7 was similar to that of ICOVIR-5,

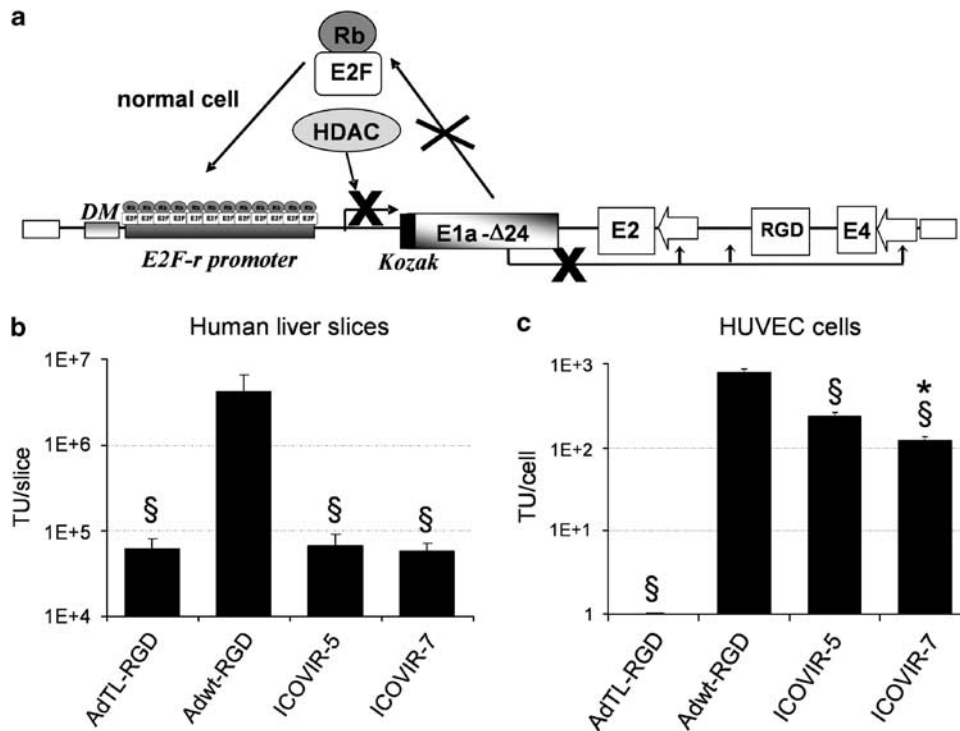


Figure 1 Abrogation of ICOVIR-7 replication in normal cells. (a) Diagram of ICOVIR-7 components that repress replication in normal cells. ICOVIR-7 incorporates four extra palindromes of E2F-responsive sites in the E2F-responsive promoter controlling E1A- Δ 24. In quiescent cells, the E2F transcription factor forms a complex with functional pRb. The binding of the complex to these hairpins of E2F-responsive sites avoids E1A- Δ 24 transcription by the docking of histone deacetylase to the complex. The Δ 24-deleted E1A cannot disrupt the pRb-E2F complex, which prevents a vicious circle of autoactivation by E2F in case of promoter leakage. Furthermore, the DM-1 insulator avoids selectivity loss by the endogenous E1A enhancer. (b) Viral replication in human liver slices. Human liver slices were infected at 50 transduction units per cell (TU per cell) and viral yield (TU per slice) was determined in slice extracts at day 6 after infection. AdTL-RGD is a replication-deficient control, AdwtRGD is a nonselective positive control, whereas ICOVIR-5 is an older oncolytic virus featuring a prototype E2F-1 promoter for controlling E1A- Δ 24 transcription. (c) Viral replication in normal human umbilical vein endothelial cells (HUVECs). HUVECs were infected with a nonreplicative virus (AdTL-RGD), with AdwtRGD, ICOVIR-5 or ICOVIR-7 at a multiplicity of infection of 40 and virus production was measured in cell extracts 5 days after infection as indicated in Materials and methods. The means of four independent replicas are shown and two independent experiments were carried out. +s.d. error bars are plotted. §Significant $P < 0.05$ by two-tailed unpaired Student's t -test, compared with that of the AdwtRGD-infected group. *Significant $P < 0.05$ by two-tailed unpaired Student's t -test, compared with that of the ICOVIR-5-infected group.

which is a highly selective virus, but also somewhat abrogated in terms of potency in tumor cells.¹⁷

The E2F-binding hairpins in ICOVIR-7 rescue oncolytic potency in vitro

E2F-responsive sites have a double role in controlling transcription.⁵ Besides repressing transcription when E2F is bound to pRb, they also activate transcription when E2F is released, as occurs in cancer cells. Figure 4a depicts the manner in which new E2F-responsive palindromes introduced in the ICOVIR-7 E1A- Δ 24-controlling promoter cooperate with the E4-6/7 protein to activate replication and overcome the attenuation that ICOVIR-5 presents in some cancer cell lines. To test oncolytic potency *in vitro*, a panel of tumor cell lines, including lung, cervix, prostate, colon, head and neck carcinoma, melanoma and osteosarcoma, was infected. E1A expression 20 h after infection and virus production 4 days after infection were analyzed for ICOVIR-7 and control viruses.

E1A is the first gene expressed from the adenovirus genome and controls the expression of other virus genes.^{25,26} The enhancement of its selective expression

in tumor cells may result in an increase of oncolytic potency. In this regard, ICOVIR-7 was able to restore E1A levels similar to AdwtRGD on all tested cancer cell lines, as analyzed by western blot (Figure 4b). A densitometric quantification of E1A bands revealed an increase in E1A levels by 17% in A549, by 152% in Saos-2, by 119% in 1.36.1.5 and by 254% in SCC-25 cells with respect to ICOVIR-5. It is significant that this restoration of expression was more evident in the cancer cell lines in which the E1A expression of ICOVIR-5-infected cells was reduced (Saos-2, 1.36.1.5 and SCC-25).

A near wild-type level of E1A expression is important to maintain an efficient virus replication.²⁷ ICOVIR-5 progeny production was attenuated in some cancer cell lines and ICOVIR-7 was able to increase its replication in most of them, namely, in Saos-2, Sk-mel28, 1.36.1.5, C33A and Isrec-01 (Figure 4c). Significantly, this improvement was most apparent in Saos-2 and Sk-mel28, in which ICOVIR-5 replication was weakened compared with that of AdwtRGD. In addition, cytopathic effect assays were carried out to determine IC₅₀ in different tumor cell lines. The amount of ICOVIR-7 needed to kill 50% of cells was lower in all tumor cell lines tested (Supplementary Table 1). These data indicate that the insertion of

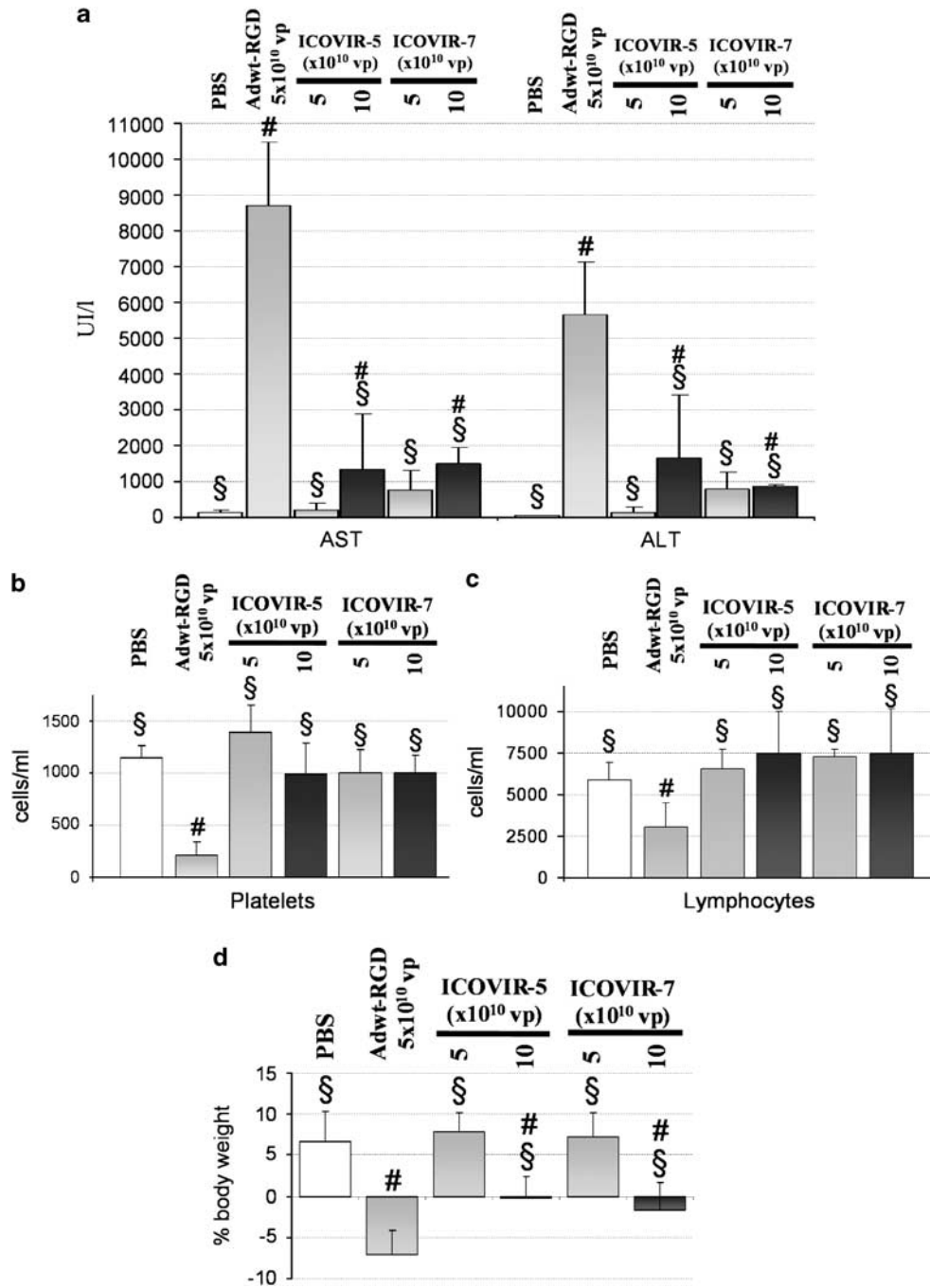


Figure 2 *In vivo* toxicity profile of ICOVIR-7. Body weight variation (a) and serum transaminase (b), platelet (c) and lymphocyte (d) concentrations in Balb/C mouse peripheral blood at day 5 after intravenous administration of phosphate-buffered saline (PBS) or ICOVIRs; the AdwtRGD-injected group was analyzed at day 3 after administration because this dose represented more than the LD₅₀ at day 4 and it was analyzed only at the lower dose because it is lethal at day 3 after administration with the higher dose. §Significant $P < 0.05$ by two-tailed unpaired Student's *t*-test, compared with that of the AdwtRGD group. #Significant $P < 0.05$ by two-tailed unpaired Student's *t*-test, compared with that of the PBS group.

additional E2F-responsive sites in E1A-controlling promoter results in improved oncolytic potency *in vitro* and may involve a more efficient antitumor treatment *in vivo*.

Antitumor efficacy of ICOVIR-7 after systemic administration

Subcutaneous models were selected to represent a wide range of tumor types. As disseminated disease is the

most relevant clinical situation, mice bearing C33A (cervix), Sk-mel28 (melanoma), NP-18 (pancreatic adenocarcinoma) or PC-3 (prostate) tumors were injected with a single intravenous dose of ICOVIR-7, ICOVIR-5 or PBS. AdwtRGD could not be tested in these experiments because of its high toxicity at treatment doses, as shown in Figure 2.

When animals with C33A tumors were treated with PBS, tumor size at day 32 was 7.3-fold larger than in mice

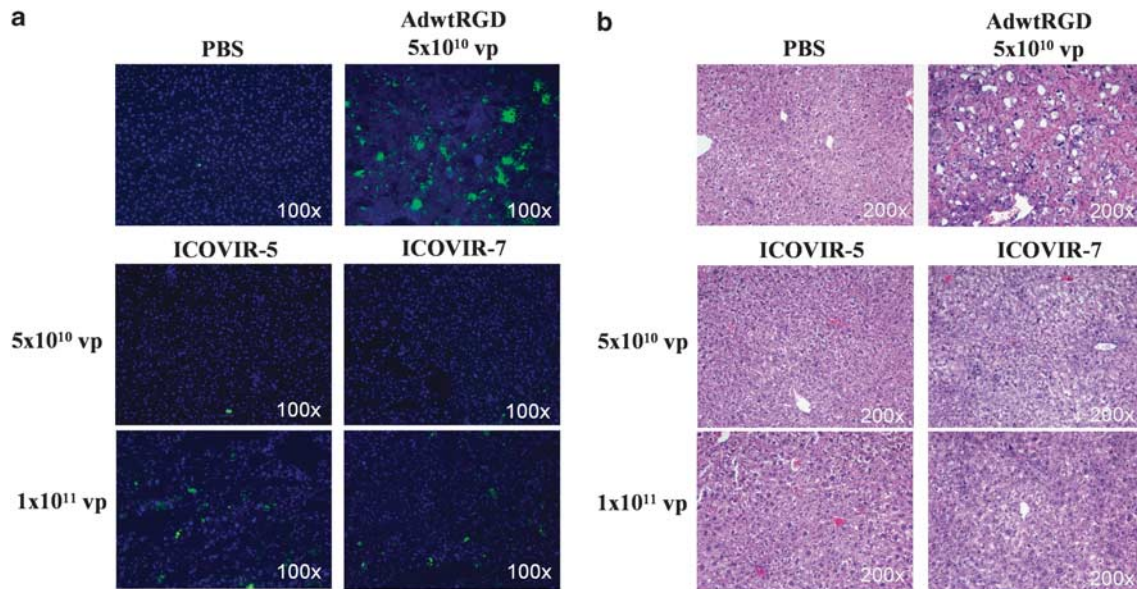


Figure 3 ICOVIR-7 retains the high selectivity of ICOVIR-5 with regard to hepatic toxicity and expression of E1A *in vivo*. Liver E1A expression was assessed by immunohistofluorescence in frozen sections (a) and hematoxylin–eosin staining of equivalent paraffin-embedded liver sections was performed (b). Mouse livers from mice injected with ICOVIR-5 or ICOVIR-7 at both doses were close to negative for E1A expression and hepatic toxicity, whereas livers from mice injected at 5×10^{10} viral particles (vp) present intense E1A expression and evident signs of hepatitis, such as macrosteatosis, for the presence of Councilman bodies and large necrotic areas.

treated with ICOVIR-7 ($P < 0.05$) (Figure 5a). Furthermore, ICOVIR-7 seemed more effective than ICOVIR-5, as tumor size was 1.75-fold larger in the latter group (not significant). In mice with Sk-mel28 tumors, tumor size in PBS-treated mice was 2.6-fold higher than in the ICOVIR-7 group ($P < 0.0009$) (Figure 5b). Moreover, tumors in mice treated with ICOVIR-5 were 1.7-fold larger than those in mice treated with ICOVIR-7 ($P < 0.05$). In mice bearing NP-18 tumors, an aggressive model of pancreatic adenocarcinoma, tumor size in PBS-treated animals was twofold larger than that in the ICOVIR-7 group ($P < 0.00002$) (Figure 5c). Tumors treated with ICOVIR-5 at the end of the experiment were 1.5-fold larger than those treated with ICOVIR-7 ($P < 0.01$). In mice with PC-3 xenografts, a single intravenous treatment was not as effective as in the other two models perhaps because of higher amounts of hyaluronic acid and other matrix components.^{28,29} However, tumors in PBS-treated animals were nevertheless 1.7-fold larger than in ICOVIR-7-treated animals ($P < 0.05$) (Figure 5d) and tumors in ICOVIR-5-treated animals were 1.2-fold bigger than those in the ICOVIR-7 group (not significant).

Viral replication in tumors after systemic injection of ICOVIR-7 was shown by immunohistofluorescence for adenoviral capsid proteins. Tumors were collected at day 25 after injection. No capsid proteins were observed in untreated tumors, whereas positive cells were observed in ICOVIR-7-treated tumors (Figure 5e).

Discussion

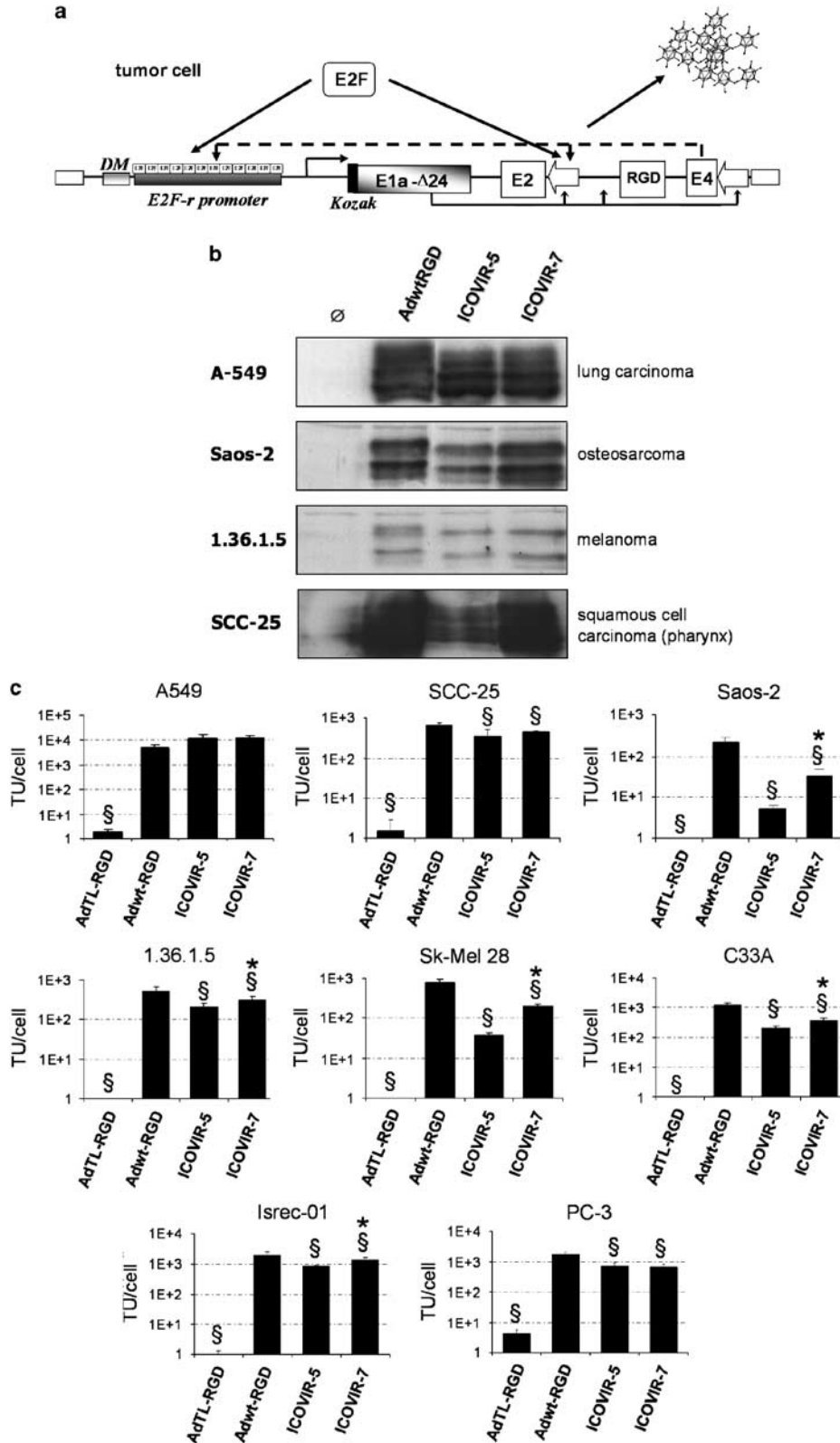
Treating tumors at an advanced stage requires systemic delivery. Clinical data with oncolytic adenoviruses injected systemically indicate the need for more potent and selective viruses. Those tested in patients have

proven to be relatively safe, showing evidence of efficacy.^{22,30–32} However, some potentially concerning adverse effects were observed at high doses and most responses detected were transient, suggesting the need for enhancing efficacy. Therefore, further research is required to improve selectivity and, above all, potency of these viruses.

Tumors cells are characterized by presenting defects in the Rb pathway, which inhibit pRb binding to E2F.⁴ An oncolytic adenovirus that takes advantage of this deregulation may acquire a selective replication for tumor cells. The first modification aiming conditional replication in Rb pathway-deficient cells was the $\Delta 24$ (d1922–947) deletion.^{12,13} This modification consists of deleting the pRb-binding site of the conserved region 2 (CR2) of E1A proteins. E1A proteins, besides being the first viral proteins synthesized from the adenovirus genome and capable of activating the transcription of other virus genes, activate the cell cycle through binding to the pRb, p130 and p107 family of proteins.³³ The formation of this complex releases E2F from pRb to allow the transcription activation of viral and cellular genes containing E2F-responsive sites. As the Rb pathway is dysfunctional in virtually all tumor cells,⁴ E1A binding to pRb is not necessary in malignant cells. Therefore, $\Delta 24$ deletion results in attenuated replication in normal cells while preserving oncolytic potency. Furthermore, a virus combining this deletion with the insertion of an RGD motif at the HI loop of the fiber has shown improved oncolytic potency.³⁴ Despite this inability to release E2F, hepatic toxicity is observed when this virus is injected systemically, as E1A transcription is not regulated and takes place in normal cells.¹⁸ For the systemic treatment of disseminated cancer, E1A transcription control is required. In this regard, the E2F-1 promoter has previously been used to direct E1A transcription in response to Rb pathway deregulation.^{35–37} Among

several cellular E2F-responsive promoters, E2F-1 is a popular choice because of its efficient E2F-binding structure, which consists of four binding sites organized as two imperfect palindromes.^{7,8} Besides the E2F release by E1A, the adenoviral E4-6/7 protein has also evolved

to increase free E2F levels. This protein interacts directly with different members of the E2F family and mediates the stable binding and activation of the E2F-1 promoter.¹¹ As a result, we reach an efficient and important positive feedback loop in tumor cells when this promoter is



placed to control E1A transcription. Furthermore, the loop is increased by the presence of a similar E2F-binding structure in the E2a promoter of adenovirus 5.³⁸ Previously, our group has shown the importance of combining $\Delta 24$ deletion with an insulated E2F-1 promoter that controls E1A transcription as a safety measure in case of promoter leakage.²⁷ The binding of zinc-finger protein CTCF to the insulator DM-1 prevents transcription from E1A enhancers and the $\Delta 24$ deletion abrogates a feedback loop in normal cells. Furthermore, we also showed that oncolytic potency can be enhanced by using the optimal ribosome recognition sequence upstream of E1A.¹⁷

Taking into consideration the sophisticated cooperation of E1A- $\Delta 24$ and E4-6/7 with the unique structure of

E2F sites present in E2F-1 promoter to activate/repress replication, we decided to magnify this mechanism by multiplying the number of these unique structures in the E1A-controlling promoter. Thus, ICOVIR-7 incorporates eight new E2F-binding sites organized as four palindromes in addition to the endogenous ones present in the wild-type E2F-1 promoter. The new sites were inserted upstream of CAAT boxes to avoid interfering on transcription initiation. As a result, higher levels of free E2F binding may increase E1A transcription in cancer cells. This may lead to a higher activation of viral promoters, resulting in higher levels of the E4-6/7 protein and activating a potent loop of E1A and E2a production that may culminate in a more efficient production of virus in cancer cells. Our results corrob-

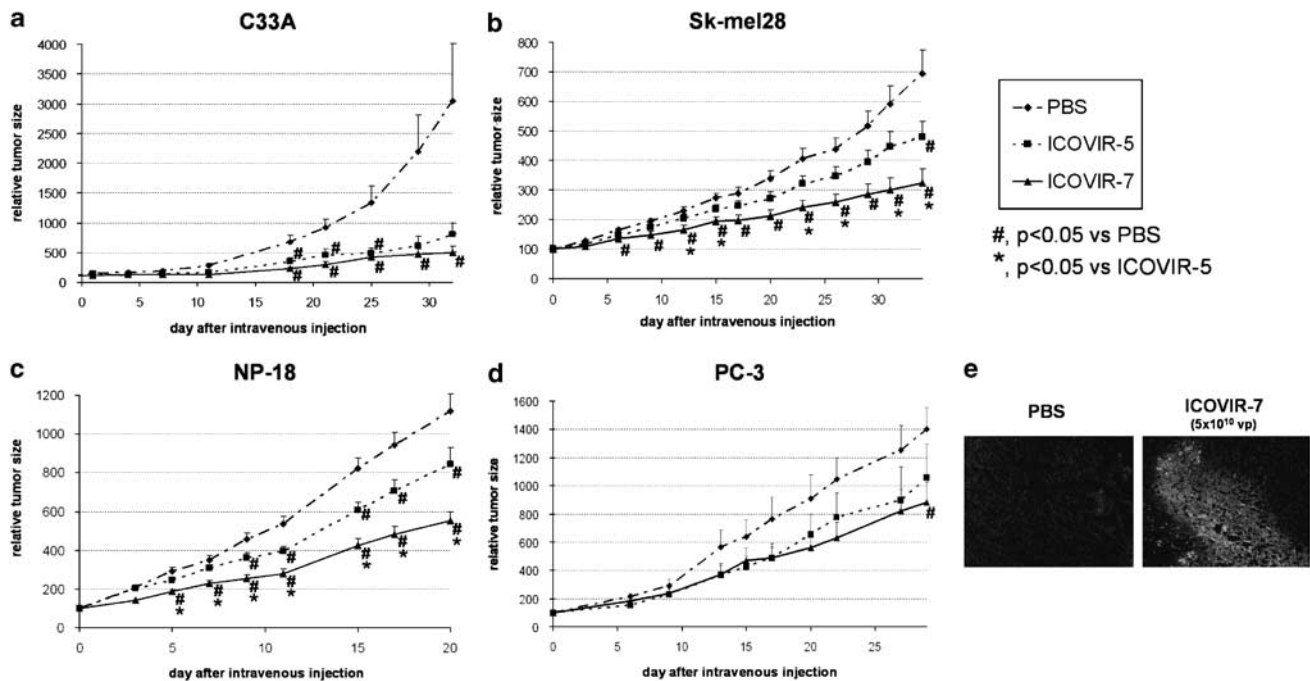


Figure 5 Systemic antitumor efficacy *in vivo*. Nude mice with subcutaneous xenografts ($\sim 100 \text{ mm}^3$) of C33A (a), Sk-mel28 (b), NP-18 (c) or PC-3 (d) were randomized into groups and treated with a single intravenous dose of phosphate-buffered saline (PBS) (solid diamonds), ICOVIR-5 (solid squares) or ICOVIR-7 (solid triangles). $n = 10\text{--}16$ tumors per group. Dose is 1×10^{11} viral particles (vp) in panel a and 5×10^{10} vp in panels b–d). The percentage of tumor growth \pm s.e. is plotted. #Significant $P < 0.05$ by two-tailed unpaired Student's *t*-test compared with that of mice injected with PBS. *Significant $P < 0.05$ by two-tailed unpaired Student's *t*-test compared with that of mice injected with ICOVIR-5. (e) Detection of ICOVIR-7 replication in Sk-mel28 tumors at day 25 after intravenous administration. Antiadenovirus immunohistochemistry was carried out and counterstained with 4',6-diamino-2-phenylindole to reveal replication of ICOVIR-7 throughout the treated tumors.

Figure 4 Potency of ICOVIR-7 in tumor cells. (a) Mechanism of activation of ICOVIR-7 replication in tumor cells. Deregulation of the pRb pathway releases the E2F transcription factor, which activates E1A- $\Delta 24$ transcription by binding to E2F-palindrome sites present in the E2F-responsive promoter of ICOVIR-7. The Kozak sequence increases E1A- $\Delta 24$ translation efficacy, which activates the other adenoviral promoters. The E4-6/7 protein forms a complex with E2F and increases the transcription of E1A- $\Delta 24$ and E2 in an efficient circle of autoactivation and lysis of cancer cells. The RGD-modified fiber increases virus infectivity. (b) The modified E2F-responsive promoter of ICOVIR-7 increases E1A expression in tumor cell lines in comparison with the prototype promoter in ICOVIR-5. Anti-E1A western blots were performed on cell extracts obtained 24 h after infection with a dose of each virus, which allowed more than 80% of transduction (40 multiplicity of infection (MOI) for SCC-25; 20 MOI for Saos-2 and 1.36.1.5; and 10 MOI for A549 cells). (c) Replication of ICOVIR-7 in tumor cells. Different tumor cell lines were infected as indicated in (b) or with an MOI of 20 for Sk-mel28, Isrec-01 and PC-3 cells and with an MOI of 10 for C33A cells. Virus production was measured 4 days after infection as indicated in Materials and methods. A previous infection in 293 cells (which allows E1a-independent adenoviral replication) was used to normalize the different virus preparations. Viral yield was evaluated in quadruplicate for each cell line, by carrying out two independent experiments. \pm s.d. error bars are plotted. #Significant $P < 0.05$ by two-tailed unpaired Student's *t*-test, compared with that of the AdwtRGD group. * $P < 0.02$ versus that of the ICOVIR-5-infected group according to a two-tailed unpaired Student's *t*-test.

rate this hypothesis. E1A production was enhanced in all cancer lines tested (Figure 4b) and this had a positive effect on virus production, increasing the number of virions produced by most of the tumor cell lines tested (Figure 4c). Importantly, this enhancement was maintained when viruses were tested in subcutaneous mouse models. A substantial benefit in the control of tumor growth was observed after a systemic injection of ICOVIR-7 compared with ICOVIR-5 (Figures 5a–d). Therefore, our data suggest that high levels of E1A are important to maintain oncolytic potency in all tumor cell models, contrary to some reports in which reduced E1A expression had little effect on replication.^{39,40}

Theoretically, the new E2F-binding sites may attach a higher number of E2F–pRb–histone deacetylase complexes in normal cells and this may strengthen the association of nucleosomes with DNA, increasing transcription repression.⁵ However, our results indicate that selectivities of ICOVIR-5 and ICOVIR-7 are similar. Liver (Figures 1b, 2a and 3) and hematological toxicity (Figures 2b and c) is not reduced by this promoter modification. This is probably because of the fact that the genetic combination present in ICOVIR-5 already efficiently restricts replication in normal cells when injected systemically, showing selectivity levels difficult to improve. This is clearly observed in Figure 1b, in which replication of both ICOVIRs in liver slices was similar to that of a nonreplicating virus (AdTL-RGD), indicating the detection of remaining viruses and discarding replication in that model. After the administration of adenoviruses, there is an induction of two distinct peaks of inflammatory response occurring at 6 h and 5 days.⁴¹ The early phase is capsid mediated and the second peak is dependent on the transcription of viral proteins. The low levels of E1A expression in the liver driven by both ICOVIRs (Figure 1a) and previous toxicity experiments injecting 1×10^{11} UV-psoralen-inactivated viral particles (data not shown) suggest that the transaminase elevation and the slight loss of weight observed after injection of 1×10^{11} viral particles of ICOVIRs are probably because of the toxicity caused by adenoviral capsids, not by E1A. In addition, replication in HUVECs (Figure 1c) shows an advantage of ICOVIR-7 in terms of selectivity, but cultured cells arrested by serum deprivation are less reliable as a normal cell model because of the difficulty to be completely arrested. In fact, we detected proliferation markers (cyclin E and Ki-67) in HUVECs or in human hepatocyte extracts by western blot analysis (data not shown), even after serum deprivation. This proliferating status might explain the small difference in terms of replication in HUVECs between wild-type virus and ICOVIRs. Importantly, western blot analysis did not reveal detection for proliferation markers in human liver slice extracts. Thus, we can conclude that the genetic combination present in the ICOVIR backbone properly controls E1A-mediated toxicity.

Despite the potential enhancement of antitumor potency, complete regression of tumors was not achieved in mice models. Tumor masses, besides cancer cells, are composed of stromal areas, including fibroblasts, endothelial and immune cells and matrix components such as collagen or hyaluronan acid. Many tumor types are characterized by small groups of tumor cells surrounded by large areas of stroma and this may limit the

intratumoral spread of viruses, especially when replication is restricted to cancer cells.^{42,43} Figure 5d shows how the use of a xenograft model (PC-3) expressing high amounts of matrix components^{28,29} reduces the efficacy of ICOVIR-7 with respect to other models. Arming adenoviruses with therapeutic transgenes is a rational approach to circumvent these barriers. The coadministration of soluble hyaluronidase with oncolytic adenoviruses⁴⁴ or the expression of relaxin in the context of an oncolytic adenovirus⁴⁵ seems promising. Alternatively, the use of prodrug-converting enzymes may represent a useful tool to breach endothelial and fibroblastic cell barriers.^{46–48} Thus, incorporation of different transgenes into the ICOVIR-7 backbone is under consideration. Restriction of the expression of these transgenes in normal cells and their compatibility with the viral life cycle are important issues to be considered. Late expression has been postulated as a good solution to avoid such problems, as major late promoter transcription is subjugated to E1A expression.⁴⁹ The tight control of E1A exerted by the ICOVIR-7 backbone implies that incorporation of a transgene expressed late in the viral cycle may contribute to tumor eradication without increasing toxicity in normal cells.

In summary, our data point toward ICOVIR-7 being a potent oncolytic agent against a broad range of tumors that present limited toxicity when injected systemically. However, further research needs to be carried out to achieve total tumor regression with a single intravenous adenovirus dose.

Materials and methods

Cell culture

HEK293 (human embryonic kidney cells), A549 (human lung adenocarcinoma), SkMel-28 (melanoma), SCC-25 (head and neck squamous carcinoma), Saos-2 (osteosarcoma) and C33A (cervix carcinoma) cell lines were obtained from American Type Culture Collection (Manassas, VA, USA). NP-18 (pancreatic adenocarcinoma) was obtained from our laboratory.⁵⁰ The 1.36.1.5 (a clone of SkMel-131, melanoma) cell line was a kind gift from FX Real (Institut Municipal d'Investigació Mèdica, Barcelona, Spain). Isrec-01 (colon cancer cell line) was a kind gift from R Iggo (University of St Andrews, Scotland, UK). HUVECs (human umbilical vein endothelial cells) were purchased from Cambrex Bio Science Baltimore Inc. (Baltimore, MD, USA). All tumor cell lines, excluding Isrec-01, were maintained in Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) containing 5% fetal bovine serum at 37 °C, 5% CO₂. The DMEM of Isrec-01 cells was supplemented with 10% fetal bovine serum. HUVECs were cultured in endothelial cell medium.

Viruses

AdwtRGD, AdTL-RGD and ICOVIR-5 have been previously described.^{17,51,52} All these viruses were propagated in A549 cells, excluding the replication-deficient AdTL-RGD, which was propagated in HEK293 cells. ICOVIR-7 was created by inserting two E2F-binding site hairpins in the E2F-1 promoter of ICOVIR-5. To this aim, a unique *BsiWI* site was created in the E2F-1 promoter of pGEM-E2F-K-E1A-Δ24 by site-directed mutagenesis. Using this plasmid digested with *BsiWI* and oligonucleo-

tides E2FF2 (5'-GTACGTCGGCGGCTCGTGGCTCTTTCGCGCAAAAAGGATTTGGCGCGTAAAAGTGGTTTCGA A-3') and E2FR2 (5'-GTACTTCGAACCACTTTTACGCG CCAAATCCTTTTTGCCGCGAAAGAGCCACGAGCCG CCGAC-3') annealed, pGEM-E2F3-K-E1A-Δ24 was created. The *KpnI* fragment containing the modified version of the E2F-1 promoter was inserted into pShuttle-DM-E2F-K-E1A-Δ24 to generate pShuttle-DM-E2F3-K-E1A-Δ24. Finally, this plasmid was recombined with pVK503 by homologous recombination in *Escherichia coli* BJ to construct pICOVIR-7. ICOVIR-7 was obtained by transfection of the *PacI* fragment of pICOVIR-7 in HEK293 cells. The virus was plaque purified, amplified in A549 cells and purified using a CsCl gradient. The viral genome was verified by restriction analysis and by sequencing the DM-1 insulator, E2F-1 promoter, Kozak sequence, E1A-Δ24 and RGD-modified fiber using oligonucleotides oligo22 (5'-AAGTGTGATGTTGCAAG TGT-3'), KozakR (5'-CTGGCGCCATTCTTCGGTAATA ACACCTCCGTGGCAGATAATATGT-3'), 1R (5'-CCTCC GGTGATAATGACAAG-3') and FiberUp (5'-CAAACGC GTTGGATTTATG-3').

Human liver slice preparation

Human liver samples were obtained from the Department of Surgery of the Hospital Universitari de Bellvitge (L'Hospitalet de Llobregat, Spain), with approval from the Research Ethics Committee. Liver slices were prepared using a Krumdieck Tissue Slicer (Alabama R&D, Munford, AL, USA) as described.^{53,19} The slices were washed and incubated for 2 h before infection at 37 °C with Williams' E medium saturated with 95% O₂/5% CO₂ and supplemented with 10% fetal bovine serum, insulin (0.1 μM) and D-glucose (25 mM).

E1A protein expression analysis

Cell cultures (~2 × 10⁵ cells seeded in 6-well plates) were infected at a multiplicity of infection that allowed at least 80% infectivity (multiplicity of infection (MOI) of 40 for SCC25 cells, MOI of 20 for 1.36.1.5 and Saos-2 cells and MOI of 10 for A549 cells). Whole-cell protein extracts were prepared 24 h after infection by incubation in lysis buffer (400 mM NaCl, 1 mM EDTA, 5 mM NaF, 10% glycerol, 1 mM sodium orthovanadate, 0.5% Nonidet NP-40 and a mixture of protease inhibitors (Sigma, St Louis, MO, USA) in 10 mM Tris-HCl pH 7.4) for 1 h at 4 °C. Clarified samples (15 μg per lane) were separated by a 10% SDS polyacrylamide gel electrophoresis and were transferred to a nitrocellulose membrane (GE Healthcare, Arlington Heights, IL, USA). Detection was carried out by immunoblotting membranes using a polyclonal anti-E1A primary antibody (Rabbit, Clone 13S-5) (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA) and a polyclonal anti-rabbit conjugated with horseradish peroxidase (goat, DakoCytomation, Glostrup, Denmark). E1A bands from western blot were quantified using a BIO-RAD GS-800 densitometer (Bio-Rad, Hercules, CA, USA).

Virus progeny production

Cell cultures (~2 × 10⁵ cells seeded in 6-well plates) were infected at an MOI that allowed at least 80% infectivity (MOI of 40 for SCC25 and HUVECs, MOI of 20 for Sk-mel28, PC-3, Isrec-01, 1.36.1.5 and Saos-2 cells and MOI of 10 for C33A and A549 cells). Human liver slices were infected at an MOI of 50, with an estimated cell number

of 1 × 10⁶ cells per slice on the basis of a 10-cell-thick slice (~250 μm) and an 8-mm-slice diameter.¹⁹ At 2 h after infection, cultures were washed twice and incubated in a fresh virus-free medium. At day 4 after infection for cell cultures or at day 6 for human liver slices, cells and medium were harvested together and freeze thawed thrice. Viral titers were determined by an antihexon staining-based method.²⁷

In vivo toxicity study

Mice for toxicological and efficacy studies were maintained in the facility of the Institut de Recerca Oncològica-IDIBELL (Barcelona), AAALAC unit 1155. All animal studies were approved by the Institut d'Investigació Biomedica de Bellvitge Ethical Committee for Animal Experimentation. Purified viral particles (5 × 10¹⁰ or 1 × 10¹¹) were injected intravenously into the tail vein of 6-week-old immunocompetent Balb/C male mice in a volume of 10 ml kg⁻¹ in PBS (*n* = 5). Daily observations for body weight, morbidity and moribundity were carried out. At day 3 after injection for AdwtRGD-injected mice and at day 5 after injection for ICOVIRs- and PBS-treated animals, the mice were killed and different samples were collected. Blood samples were collected by intracardiac puncture, and clinical biochemical and hematological determinations were carried out by the Clinical Biochemistry and Hematological Services of the Veterinary Faculty at the Autonomous University of Barcelona. The significance of differences in biochemical and hematological rates between treatment groups was assessed by a two-tailed Student's unpaired *t*-test. Mice livers were resected and portions were fixed in 4% formaldehyde for 24 h at room temperature (for paraffin embedding and further hematoxylin-eosin staining) or frozen in OCT. E1A-immunodetection was performed by incubating OCT-embedded liver sections with a primary polyclonal antibody antiadenovirus-2 E1A (clone 13 S-5, Santa Cruz Biotechnology) and an AlexaFluor 488-labeled goat anti-rabbit antibody (Molecular Probes, Eugene, OR, USA). Slides were counterstained with 4',6-diamino-2-phenylindole and visualized under a fluorescent microscope (Olympus BX51, Hamburg, Germany).

In vivo antitumoral efficacy

Subcutaneous C33A cervical, SkMel-28 melanoma, NP-18 pancreatic adenocarcinoma or PC-3 prostate carcinoma tumors were infused by injection of 1 × 10⁷ cells into the flanks of 6-week-old male Balb/C *nu/nu* mice. When tumors reached 100 mm³ (experimental day 0), mice were randomized (*n* = 10–16 per group) and were injected by a single intravenous injection of PBS, with 5 × 10¹⁰ (for SkMel-28, NP-18 and PC-3 model) or 1 × 10¹¹ (for C33A model) viral particles of ICOVIR-5 or with 5 × 10¹⁰ (for SkMel-28, NP-18 and PC-3 model) or 1 × 10¹¹ (for C33A model) viral particles of ICOVIR-7 in a volume of 10 ml kg⁻¹ in PBS through the tail vein. Tumor size and mice status were monitored thrice a week. Tumor volume was defined by the equation $V \text{ (mm}^3\text{)} = \pi/6 \times W \times L^2$, where *W* and *L* are the width and length of the tumor, respectively. The percentage of growth was calculated as $((V - V_0) / V_0) \times 100$, where *V*₀ is the tumor volume on day 0. The significance of differences in tumor growth rate between treatment groups was assessed by a two-tailed Student's unpaired *t*-test.

OCT-embedded sections of tumors obtained at day 25 after treatment were used to detect adenoviral proteins. Immunodetection was performed using polyclonal anti-adenovirus (ab6982; Abcam, Cambridge, UK) as the primary antibody and an AlexaFluor 488-labeled goat anti-rabbit antibody (Molecular Probes). Rabbit immunoglobulin G was used as control. Slides were counterstained with 4',6-diamino-2-phenylindole and visualized under a fluorescent microscope (Olympus BX51). Representative photographs of each slide were taken.

Conflict of interest

The authors declare no conflict of interest.

Acknowledgements

We thank Blanca Luena and Eduard Serra for their technical assistance. We also thank pathologist Teresa Serrano from the Department of Pathology of the Hospital Universitari de Bellvitge, Spain, for procurement of human liver biopsies. JJ Rojas was supported by a predoctoral fellowship (FI) granted by the Generalitat de Catalunya. This work was supported by BIO2008-04692-C03-01 from the Ministerio de Ciencia y Tecnología of the Government of Spain (RA), EU 6th FP research contract 18700 (Theradpox, RA), 2005 SGR 00727 from the Departament d'Universitats, Recerca i Societat de la Informació of the Generalitat de Catalunya and by Mutua Madrileña Medical Research Foundation. R. Alemany is a member of the Network of Cooperative Research on Cancer (C03-10), Instituto de Salud Carlos III of the Ministerio de Sanidad y Consumo, Government of Spain. A Hemminki is K. Albin Johansson Research Professor of the Foundation for the Finnish Cancer Institute and supported by the European Research Council, HUCH Research Funds (EVO), Sigrid Juselius Foundation, Academy of Finland, Biocentrum Helsinki and Finnish Cancer Society.

References

- 1 Bauzon M, Hermiston TW. Exploiting diversity: genetic approaches to creating highly potent and efficacious oncolytic viruses. *Curr Opin Mol Ther* 2008; **10**: 350–355.
- 2 Rodriguez R, Schuur ER, Lim HY, Henderson GA, Simons JW, Henderson DR. Prostate attenuated replication competent adenovirus (ARCA) CN706: a selective cytotoxic for prostate-specific antigen-positive prostate cancer cells. *Cancer Res* 1997; **57**: 2559–2563.
- 3 Fuerer C, Iggo R. Adenoviruses with Tcf binding sites in multiple early promoters show enhanced selectivity for tumour cells with constitutive activation of the wnt signalling pathway. *Gene Therapy* 2002; **9**: 270–281.
- 4 Sherr CJ, McCormick F. The RB and p53 pathways in cancer. *Cancer Cell* 2002; **2**: 103–112.
- 5 Black AR, Azizkhan-Clifford J. Regulation of E2F: a family of transcription factors involved in proliferation control. *Gene* 1999; **237**: 281–302.
- 6 Johnson DG, Degregori J. Putting the oncogenic and tumor suppressive activities of E2F into context. *Curr Mol Med* 2006; **6**: 731–738.
- 7 Neuman E, Flemington EK, Sellers WR, Kaelin Jr WG. Transcription of the E2F-1 gene is rendered cell cycle dependent

- by E2F DNA-binding sites within its promoter. *Mol Cell Biol* 1994; **14**: 6607–6615.
- 8 Neuman E, Flemington EK, Sellers WR, Kaelin Jr WG. Transcription of the E2F-1 gene is rendered cell cycle dependent by E2F DNA-binding sites within its promoter. *Mol Cell Biol* 1995; **15**: 4660.
- 9 Kovcsdi I, Reichel R, Nevins JR. Identification of a cellular transcription factor involved in E1A trans-activation. *Cell* 1986; **45**: 219–228.
- 10 Cress WD, Nevins JR. Use of the E2F transcription factor by DNA tumor virus regulatory proteins. *Curr Top Microbiol Immunol* 1996; **208**: 63–78.
- 11 Schaley J, O'Connor RJ, Taylor LJ, Bar-Sagi D, Hearing P. Induction of the cellular E2F-1 promoter by the adenovirus E4-6/7 protein. *J Virol* 2000; **74**: 2084–2093.
- 12 Fueyo J, Gomez-Manzano C, Alemany R, Lee PS, McDonnell TJ, Mitlianga P et al. A mutant oncolytic adenovirus targeting the Rb pathway produces anti-glioma effect *in vivo*. *Oncogene* 2000; **19**: 2–12.
- 13 Heise C, Hermiston T, Johnson L, Brooks G, Sampson-Johannes A, Williams A et al. An adenovirus E1A mutant that demonstrates potent and selective systemic anti-tumoral efficacy. *Nat Med* 2000; **6**: 1134–1139.
- 14 Jakubczak JL, Ryan P, Gorziglia M, Clarke L, Hawkins LK, Hay C et al. An oncolytic adenovirus selective for retinoblastoma tumor suppressor protein pathway-defective tumors: dependence on E1A, the E2F-1 promoter, and viral replication for selectivity and efficacy. *Cancer Res* 2003; **63**: 1490–1499.
- 15 Alonso MM, Cascallo M, Gomez-Manzano C, Jiang H, Bekele BN, Perez-Gimenez A et al. ICOVIR-5 shows E2F1 addiction and potent anti-glioma effect *in vivo*. *Cancer Res* 2007; **67**: 8255–8263.
- 16 Alonso MM, Gomez-Manzano C, Jiang H, Bekele NB, Piao Y, Yung WK et al. Combination of the oncolytic adenovirus ICOVIR-5 with chemotherapy provides enhanced anti-glioma effect *in vivo*. *Cancer Gene Ther* 2007; **14**: 756–761.
- 17 Cascallo M, Alonso MM, Rojas JJ, Perez-Gimenez A, Fueyo J, Alemany R. Systemic toxicity-efficacy profile of ICOVIR-5, a potent and selective oncolytic adenovirus based on the pRB pathway. *Mol Ther* 2007; **15**: 1607–1615.
- 18 Engler H, Machemer T, Philopena J, Wen SF, Quijano E, Ramachandra M et al. Acute hepatotoxicity of oncolytic adenoviruses in mouse models is associated with expression of wild-type E1a and induction of TNF-alpha. *Virology* 2004; **328**: 52–61.
- 19 Kirby TO, Rivera A, Rein D, Wang M, Ulasov I, Breidenbach M et al. A novel *ex vivo* model system for evaluation of conditionally replicative adenoviruses therapeutic efficacy and toxicity. *Clin Cancer Res* 2004; **10**: 8697–8703.
- 20 Morral N, O'Neal WK, Rice K, Leland MM, Piedra PA, Aguilar-Cordova E et al. Lethal toxicity, severe endothelial injury, and a threshold effect with high doses of an adenoviral vector in baboons. *Hum Gene Ther* 2002; **13**: 143–154.
- 21 Duncan SJ, Gordon FC, Gregory DW, McPhie JL, Postlethwaite R, White R et al. Infection of mouse liver by human adenovirus type 5. *J Gen Virol* 1978; **40**: 45–61.
- 22 Nemunaitis J, Cunningham C, Buchanan A, Blackburn A, Edelman G, Maples P et al. Intravenous infusion of a replication-selective adenovirus (ONYX-015) in cancer patients: safety, feasibility and biological activity. *Gene Therapy* 2001; **8**: 746–759.
- 23 Aghi M, Martuza RL. Oncolytic viral therapies—the clinical experience. *Oncogene* 2005; **24**: 7802–7816.
- 24 Cichon G, Schmidt HH, Benhidjeb T, Loser P, Ziemer S, Haas R et al. Intravenous administration of recombinant adenoviruses causes thrombocytopenia, anemia and erythroblastosis in rabbits. *J Gene Med* 1999; **1**: 360–371.
- 25 Rossini M. The role of adenovirus early region 1A in the regulation of early regions 2A and 1B expression. *Virology* 1983; **131**: 49–58.

- 26 Weeks DL, Jones NC. E1A control of gene expression is mediated by sequences 5' to the transcriptional starts of the early viral genes. *Mol Cell Biol* 1983; **3**: 1222–1234.
- 27 Majem M, Cascallo M, Bayo-Puxan N, Mesia R, Germa JR, Alemany R. Control of E1A under an E2F-1 promoter insulated with the myotonic dystrophy locus insulator reduces the toxicity of oncolytic adenovirus Ad-Delta24RGD. *Cancer Gene Ther* 2006; **13**: 696–705.
- 28 Ricciardelli C, Russell DL, Ween MP, Mayne K, Suwivat S, Byers S *et al*. Formation of hyaluronan- and versican-rich pericellular matrix by prostate cancer cells promotes cell motility. *J Biol Chem* 2007; **282**: 10814–10825.
- 29 Draffin JE, McFarlane S, Hill A, Johnston PG, Waugh DJ. CD44 potentiates the adherence of metastatic prostate and breast cancer cells to bone marrow endothelial cells. *Cancer Res* 2004; **64**: 5702–5711.
- 30 Habib N, Salama H, Abd El Latif Abu Median A, Isac Anis I, Abd Al Aziz RA, Sarraf C *et al*. Clinical trial of E1B-deleted adenovirus (dl1520) gene therapy for hepatocellular carcinoma. *Cancer Gene Ther* 2002; **9**: 254–259.
- 31 Small EJ, Carducci MA, Burke JM, Rodriguez R, Fong L, van Ummersen L *et al*. A phase I trial of intravenous CG7870, a replication-selective, prostate-specific antigen-targeted oncolytic adenovirus, for the treatment of hormone-refractory, metastatic prostate cancer. *Mol Ther* 2006; **14**: 107–117.
- 32 Hamid O, Varterasian ML, Wadler S, Hecht JR, Benson 3rd A, Galanis E *et al*. Phase II trial of intravenous CI-1042 in patients with metastatic colorectal cancer. *J Clin Oncol* 2003; **21**: 1498–1504.
- 33 Dyson N. The regulation of E2F by pRB-family proteins. *Genes Dev* 1998; **12**: 2245–2262.
- 34 Suzuki K, Fueyo J, Krasnykh V, Reynolds PN, Curiel DT, Alemany R. A conditionally replicative adenovirus with enhanced infectivity shows improved oncolytic potency. *Clin Cancer Res* 2001; **7**: 120–126.
- 35 Tsukuda K, Wiewrodt R, Molnar-Kimber K, Jovanovic VP, Amin KM. An E2F-responsive replication-selective adenovirus targeted to the defective cell cycle in cancer cells: potent antitumoral efficacy but no toxicity to normal cell. *Cancer Res* 2002; **62**: 3438–3447.
- 36 Ryan PC, Jakubczak JL, Stewart DA, Hawkins LK, Cheng C, Clarke LM *et al*. Antitumor efficacy and tumor-selective replication with a single intravenous injection of OAS403, an oncolytic adenovirus dependent on two prevalent alterations in human cancer. *Cancer Gene Ther* 2004; **11**: 555–569.
- 37 Johnson L, Shen A, Boyle L, Kunich J, Pandey K, Lemmon M *et al*. Selectively replicating adenoviruses targeting deregulated E2F activity are potent, systemic antitumor agents. *Cancer Cell* 2002; **1**: 325–337.
- 38 Neill SD, Hemstrom C, Virtanen A, Nevins JR. An adenovirus E4 gene product trans-activates E2 transcription and stimulates stable E2F binding through a direct association with E2F. *Proc Natl Acad Sci USA* 1990; **87**: 2008–2012.
- 39 Nettelbeck DM, Rivera AA, Balague C, Alemany R, Curiel DT. Novel oncolytic adenoviruses targeted to melanoma: specific viral replication and cytolysis by expression of E1A mutants from the tyrosinase enhancer/promoter. *Cancer Res* 2002; **62**: 4663–4670.
- 40 Hitt MM, Graham FL. Adenovirus E1A under the control of heterologous promoters: wide variation in E1A expression levels has little effect on virus replication. *Virology* 1990; **179**: 667–678.
- 41 Liu Q, Zaiss AK, Colarusso P, Patel K, Haljan G, Wickham TJ *et al*. The role of capsid-endothelial interactions in the innate immune response to adenovirus vectors. *Hum Gene Ther* 2003; **14**: 627–643.
- 42 Alemany R. Cancer selective adenoviruses. *Mol Aspects Med* 2007; **28**: 42–58.
- 43 Cheng J, Sauthoff H, Huang Y, Kutler DI, Bajwa S, Rom WN *et al*. Human matrix metalloproteinase-8 gene delivery increases the oncolytic activity of a replicating adenovirus. *Mol Ther* 2007; **15**: 1982–1990.
- 44 Ganesh S, Gonzalez-Edick M, Gibbons D, Van Roey M, Jooss K. Intratumoral coadministration of hyaluronidase enzyme and oncolytic adenoviruses enhances virus potency in metastatic tumor models. *Clin Cancer Res* 2008; **14**: 3933–3941.
- 45 Kim JH, Lee YS, Kim H, Huang JH, Yoon AR, Yun CO. Relaxin expression from tumor-targeting adenoviruses and its intratumoral spread, apoptosis induction, and efficacy. *J Natl Cancer Inst* 2006; **98**: 1482–1493.
- 46 Fuerer C, Iggo R. 5-Fluorocytosine increases the toxicity of Wnt-targeting replicating adenoviruses that express cytosine deaminase as a late gene. *Gene Therapy* 2004; **11**: 142–151.
- 47 Lukashev AN, Fuerer C, Chen MJ, Searle P, Iggo R. Late expression of nitroreductase in an oncolytic adenovirus sensitizes colon cancer cells to the prodrug CB1954. *Hum Gene Ther* 2005; **16**: 1473–1483.
- 48 Cascante A, Abate-Daga D, Garcia-Rodriguez L, Gonzalez JR, Alemany R, Fillat C. GCV modulates the antitumoural efficacy of a replicative adenovirus expressing the Tat8-TK as a late gene in a pancreatic tumour model. *Gene Therapy* 2007; **14**: 1471–1480.
- 49 Guedan S, Gros A, Cascallo M, Vile R, Mercade E, Alemany R. Syncytia formation affects the yield and cytotoxicity of an adenovirus expressing a fusogenic glycoprotein at a late stage of replication. *Gene Therapy* 2008; **15**: 1240–1245.
- 50 Villanueva A, Garcia C, Paules AB, Vicente M, Megias M, Reyes G *et al*. Disruption of the antiproliferative TGF-beta signaling pathways in human pancreatic cancer cells. *Oncogene* 1998; **17**: 1969–1978.
- 51 Bauerschmitz GJ, Lam JT, Kanerva A, Suzuki K, Nettelbeck DM, Dmitriev I *et al*. Treatment of ovarian cancer with a tropism modified oncolytic adenovirus. *Cancer Res* 2002; **62**: 1266–1270.
- 52 Dmitriev I, Krasnykh V, Miller CR, Wang M, Kashentseva E, Mikheeva G *et al*. An adenovirus vector with genetically modified fibers demonstrates expanded tropism via utilization of a coxsackievirus and adenovirus receptor-independent cell entry mechanism. *J Virol* 1998; **72**: 9706–9713.
- 53 Olinga P, Merema MT, de Jager MH, Derks F, Melgert BN, Moshage H *et al*. Rat liver slices as a tool to study LPS-induced inflammatory response in the liver. *J Hepatol* 2001; **35**: 187–194.

Supplementary Information accompanies the paper on Gene Therapy website (<http://www.nature.com/gt>)

