

Departamento de Biología Molecular

Facultad de Ciencias

Universidad Autónoma de Madrid

Vectores virales basados en poxvirus como agentes oncolíticos

Ernesto Mejías Pérez

Madrid, 2017

Memoria de Tesis Doctoral presentada por Ernesto Mejías Pérez para optar al Grado de
Doctor en Biología Molecular por la Universidad Autónoma de Madrid

Director de Tesis: Mariano Esteban Rodríguez

Centro Nacional de Biotecnología (CNB-CSIC)

Agradecimientos

Tengo que agradecer mucho y a muchos.

He llegado donde he llegado y conseguido lo que he conseguido, gracias al apoyo, esfuerzo y ayuda de mucha gente; directamente tras el trabajo aquí escrito, e indirectamente detrás de todo lo que me ha permitido mantenerme centrado y detrás de todas las veces que he tenido que aprender a levantarme cuando me he caído.

Sois muchos, así que puntualizo: el orden de los factores no altera el producto.

Querría empezar con mis padres, y aprovecho para agradecerlos TODO; pero sobre todo os agradezco el sacrificio titánico que habéis hecho para darme el privilegio de poder elegir, de poder seguir mis inquietudes y de poder tener la oportunidad de luchar por alcanzar mis metas. Os agradezco la confianza, y os agradezco el órdago a ciegas. Siempre me habéis alentado a seguir mis sueños, y habéis creído en mí cuando yo no lo he hecho. Siempre me habéis apoyado y animado cuando las cosas se han torcido y os habéis alegrado de las muchas cosas a las que yo suelo quitarles importancia. Gracias por vuestro siempre útil punto de vista, por educarme en la escuela de cuestionárselo todo y gracias por no cortarme nunca las alas.

Mis hermanos Iria y Víctor, espectadores sufrientes en primera fila de mis incansables monólogos, unas veces de lo fascinante que puede llegar a ser este mundo y otras muchas (con un tono más desesperado) de lo cuesta arriba que se hacen a veces las cosas. Gracias por estar ahí y ser una de mis válvulas de seguridad.

Lore!!! Tú eres sin duda alguna la estructura sobre la que se ha construido todo esto, de hecho esta tesis debería llevar también tu nombre en la portada. Siempre has sido mi piedra de toque, me has mantenido con un pie en el suelo y me has dado un baño de realidad cada vez que lo he necesitado (más de las que me gustaría reconocer...). Desde el principio has sabido comprender y entender mis inquietudes, y lo que éstas implicaban (sacrificios incluidos), llegándolas a hacer también tuyas. Me has obligado a seguir adelante, me has enseñado a valorar las cosas y has sido mi motivo por el que intentar mejorar y superarme cada día. Ha sido un camino difícil hasta aquí, y nadie lo sabe mejor que tú que lo has recorrido conmigo, GRACIAS!!

De la misma forma, todo esto no habría sido posible sin Mariano Esteban. Él me dio mi primera oportunidad cuando yo estaba en 3º de biotecnología, y en ese momento no supe apreciar tanto el valor de esa oportunidad como he hecho más tarde. Sobretudo quiero agradecerte que hayas dejado que la ciencia y el laboratorio sean mi patio de juegos; esta libertad ha resultado tremendamente educativa y gratificante a la vez que ha sido todo un privilegio para mí. Quiero agradecer tu confianza en mi criterio en muchas ocasiones y que me hayas dejado ser un culo inquieto que colaborase y me implicase con todo el mundo y tipo de proyectos (como tú me decías: “... *es tu tiempo, tu verás...*”), pero por encima de esto quiero agradecerte haberme dado la oportunidad de equivocarme. Aprecio mucho aquella primera oportunidad que me diste y todas las que la han seguido.

Muchas gracias en general a toda mi familia, que siempre se ha volcado conmigo y han estado cerca en todo momento. Gracias a Ani y a Lute, que en todo momento os habéis interesado por mí y habéis cuidado de mí, y nos habéis ayudado cuando ha hecho falta y cuando no. Gracias a mis abuelos (a los 4 que siempre he tenido, y a los dos que me adoptaron como nieto), siempre habéis apostado por mí y me habéis enseñado que pase lo que pase hay seguir luchando por los que quieres y por lo que se quiere. Siempre os consideraré un ejemplo a seguir, y siempre tendré presente vuestros consejos y palabras: como cuando me decías “*no te preocupes por lo que no ha pasado, y ocúpate cuando sea necesario*”; o como cuando se estropeó la tele, te dijeron que yo le echaría un vistazo y dijiste “*¡No hombre! Ernesto lo que sabe es arreglar ratones, no televisores...*”; como cuando me contabas tus experiencias con los trabajos y de la importancia de mantener claro que un trabajo es eso, un trabajo; o como cuando le contabas al Ernesto de 13 años, sobre cómo te moldean las circunstancias y las decisiones que tomas, de las ventajas y desventajas del miedo, y de la importancia de intentar mantener la mente clara y fría, sobre todo en los momentos más difíciles.

La gente del laboratorio, los que ya se han ido, los que siguen y los nuevos que han llegado. Al fin y al cabo, paso casi tanto tiempo en mi casa como en el 112, así que ésta es mi segunda residencia, y he aprendido mucho en ella (casi todo lo que sé): Lucas, tengo que agradecerte muchas cosas (empezando por ser el único al que no le pareció tan mala idea tener un estudiante aquel verano de 2008), has sido el que más me ha enseñado desde el principio desde cómo se trabaja y cómo no se trabaja, hasta cómo afrontar los desafíos, confiando y dando la cara por mí y dejándome meter mano en

todos los experimentos (hasta en los más importantes); Mauro, muchas gracias por tu frecuentemente irritante punto de vista crítico, muchas gracias por haberme dejado participar en tus logros y por haber sido un amigo dentro y fuera del laboratorio; Suresh, qué te puedo decir, hemos compartido muchos ratos lamentándonos de nuestra suerte (aunque fuese por puro vicio), y siempre has estado a mi lado cuando las cosas no han ido tan bien, gracias por enseñarme a ser mejor persona; Liliana, bien sabes tú que eres uno de los engranajes fundamentales de este proyecto, creo que hemos aprendido un montón juntos y que nos hemos divertido mucho por el camino, gracias por ser mi amiga, por creer cuando yo no lo hacía y por todo el trabajo y esfuerzo que has invertido en esto (mereces mucho); Bea, me has estado guardando las espaldas literalmente desde que empecé en el laboratorio, y ni una sola vez me has negado tu ayuda, he aprendido mucho de ti (y me llevo con cariño los consejos terapéuticos justo cuando los necesitaba); Carmen, de ti también he aprendido muchísimo, siempre has sido (tal y como me ha enseñado todo el mundo que te conoce) la gurú del laboratorio y siempre he tenido en muchísima estima tu opinión, gracias por toda la ayuda que me has prestado y todo lo que me has enseñado; Aneesh, thank you for everything, for letting me get involved in your project and listening to my ideas. Y muchísimas gracias también a todos los demás: Juan, Chogüi, Cristina, Ana, María, Patricia, Magda, Rubén, José Luis, Alan, Lidia, Pilar y Jacobo, habéis hecho que este tiempo en el laboratorio sea más fácil y llevadero y me habéis echado una mano cuando la he necesitado.

Quiero agradecer también a todo el mundo que ha estado ahí para mí científicamente o como un compañero más durante este tiempo, muchas gracias a Soco, Iván, Raquel, Manuela, Davide, Yas, Jorge, Oscar, Sole, MariCarmen, Sara, Eber, y Alberto entre un montón de gente más. Y gracias a mis amigos Iñigo y Jose, no tenéis ni idea de todo lo que habéis hecho por mí.

Resumen

El cáncer supone actualmente uno de los principales problemas de salud a nivel mundial. A pesar de la efectividad de las terapias anti-tumorales empleadas habitualmente, la cifra anual de muertes asociadas a cáncer continúa siendo devastadora. A este respecto, actualmente se han obtenido tratamientos con resultados muy prometedores, encontrándose entre ellos los poxvirus y la oncolisis viral.

En el presente trabajo se han desarrollado varios vectores virales candidatos basados en la cepa WR del virus vaccinia como agentes oncolíticos, en los que se ha llevado a cabo la delección dirigida de genes para poder conseguir un virus seguro en tejidos sanos sin que las delecciones afecten al perfil replicativo en un contexto tumoral, de esta forma sacando provecho de las condiciones particulares del microambiente tumoral dadas por las marcas distintivas del cáncer. Entre los genes delecionados para conseguir dicho objetivo, se encuentran genes virales relacionados con el metabolismo de nucleótidos (*A48R* y *J2R*), factores mitogénicos (*C11R*), genes que intervienen en el cambio metabólico celular (*C16L*) o el bloqueo de la respuesta anti-viral celular (*B18R* y *F1L*).

Tras la generación, caracterización y evaluación de los virus candidatos propuestos, se ha demostrado que el virus WR- Δ 3-Luc, con 4 genes delecionados –*A48R*, *B18R*, *C11R* y *J2R*–, se presenta como el virus que mejor se ajusta para su uso en viroterapia oncolítica. El virus WR- Δ 3-Luc ha demostrado en ensayos *in vitro* un comportamiento similar al virus salvaje WR, respecto a su capacidad de replicación en células primarias y tumorales, a la traducción de proteínas virales y a la inhibición de la apoptosis. En ensayos *in vivo*, entre los virus analizados, el virus WR- Δ 3-Luc ha mostrado la mayor reducción de la virulencia; asimismo el virus mutante de delección muestra títulos más bajos que el virus WR wt en ovarios, exudados peritoneales y cerebro en el ensayo de biodistribución tras una administración sistémica. Cuando se han analizado las poblaciones celulares del sistema inmune en el sitio de infección, el virus WR- Δ 3-Luc muestra un perfil de migración similar al que presenta el virus WR wt, destacando por encima de éste último en el incremento de los niveles de migración de neutrófilos.

A la hora de estudiar el comportamiento en tumores, los ensayos de trasplante de células de melanoma murino B16F10 muestran una capacidad superior del virus WR- Δ 3-Luc en el control del desarrollo tumoral (por encima de la observada en con el virus WR wt); mostrando a su vez que el virus mutante de delección WR- Δ 3-Luc presenta los mismos niveles de replicación en tumor que los observados en el virus WR wt, y niveles superiores en el reclutamiento en tumores de neutrófilos y linfocitos B. Por último, se ha detectado en bazos de animales con tumores tratados con el virus WR- Δ 3-Luc, linfocitos T específicos para los antígenos asociados a tumor gp100 y TRP-2, lo que demuestra la capacidad del virus candidato de romper la inmuno-tolerancia e inducir respuesta adaptativa específica frente a antígenos expresados en el tumor.

Así, estos estudios ponen de manifiesto las virtudes del virus WR- Δ 3-Luc en su uso potencial como vector oncolítico.

Summary

Cancer is one of the major health problems plaguing our society today. The death toll attributed to cancer each year continues to be devastatingly high, despite the advent of a large number of effective anti-tumour therapies in the recent years. Some of these therapies have shown considerable promise, including those based on poxvirus and viral oncolysis.

This work describes the development of viral vector candidates based on the WR strain of vaccinia virus as potential oncolytic agents. This is achieved through the targeted deletion of specific genes that, while rendering the virus safe and secure in somatic tissues, also helps the virus exploit the characteristics of a tumour micro-environment provided by the hallmarks of cancer by preserving its replication competence within the tumour. Among the genes thus deleted are those associated with nucleotide metabolism (*A48R* y *J2R*), mitogenic factors (*C11R*), those that intervene in the cellular metabolic programming (*C16L*) or block the cellular anti-viral response (*B18R* y *F1L*).

Following the successful generation, characterization and evaluation of the proposed viral vectors, the WR- Δ 3-Luc virus with four deleted genes (*A48R*, *B18R*, *C11R* and *J2R*) emerged as the candidate of choice for use in viral oncolytic therapy. *In vitro*, this virus showed similar replication capacity in primary and tumour cells, translation of viral proteins and inhibition of apoptosis to that shown by the wildtype WR virus. Among the viruses studied *in vivo*, the WR- Δ 3-Luc virus demonstrated the greatest reduction of virulence; likewise, this deletion mutant gave lower viral titres than the wildtype WR in ovaries, peritoneal washes and cerebral tissue in a bio-distribution assay following a systemic administration. When the cellular population of the immune system at the site of infection was analysed, the WR- Δ 3-Luc virus, while showing a recruitment profile similar to that of the WR, outperformed the latter in terms of the increase in the neutrophil migration levels.

In studies using the B16F10 murine melanoma cells transplant, designed to understand the viral behaviour in tumours, the WR- Δ 3-Luc virus demonstrated a superior capacity for controlling tumour growth (compared to that observed with the WR wt virus); while at the same time showing the same replication capacity in tumours as that of the WR wt, and higher levels of neutrophil and lymphocyte B recruitment. Finally, the presence of T lymphocytes specific to the tumour associated antigens gp100 and TRP-2 detected in the spleen of animals with tumours treated with the WR- Δ 3-Luc virus highlights the ability of this viral candidate to break the immune-tolerance and to induce a tumour antigen-specific adaptive response.

Therefore, these studies demonstrate the significant potential of the WR- Δ 3-Luc virus as an oncolytic vector for use in therapy against cancer.

Índice

Abreviaturas.....	19
1. Introducción	24
1.1. Poxvirus	24
1.2. Virus Vaccinia	25
1.2.1. Estructura y morfología	25
1.2.2. Organización genómica	26
1.2.3. Ciclo infectivo de VVAC (Entrada, desensamblaje, expresión génica y replicación del ADN, morfogénesis y salida)	27
1.2.4. El virus vaccinia y su aplicación como vector vacunal	31
1.3. Cáncer	31
1.3.1. La enfermedad en cifras	31
1.3.2. Tratamiento.....	33
1.4. Oncolisis viral	36
1.4.1. Historia de la oncolisis viral	37
1.4.2. Bases de la oncolisis viral.....	37
1.4.3. Marcas distintivas del cáncer.....	38
1.4.4. Mecanismo de acción de la oncolisis viral	42
1.5. La oncolisis viral y el virus vaccinia	45
1.5.1. Consideraciones generales.....	45
1.5.2. Generación de virus oncolíticos basados en el virus vaccinia.....	47
1.5.3. Genes candidatos para delecionar.....	49
2. Objetivos	52
3. Materiales y Métodos	53
3.1. Materiales.....	53
3.1.1. Líneas celulares	53
3.1.2. Medios de cultivo	53

3.1.3.	Bacterias	54
3.1.4.	Virus	55
3.1.5.	Plásmidos.....	55
3.2.	Reactivos.....	57
3.2.1.	Anticuerpos.....	57
3.2.2.	Péptidos	61
3.2.3.	Oligonucleótidos.....	61
3.2.4.	Tampones	64
3.3.	Metodología.....	64
3.3.1.	Técnicas de manipulación del ADN.....	64
3.3.1.1.	Purificación de ácidos nucleicos	65
3.3.1.2.	Análisis por PCR.....	66
3.3.1.3.	Reacción de transcripción inversa en cadena de la polimerasa (RT-PCR).....	66
3.3.1.4.	Transfección transitoria de células en cultivo	67
3.3.2.	Técnicas de manipulación de virus.....	67
3.3.2.1.	Generación de virus recombinantes de inserción.....	67
3.3.2.2.	Generación de virus mutantes de delección.....	68
3.3.2.3.	Purificación de virus.....	69
3.3.2.4.	Titulación de virus.....	70
3.3.2.5.	Curvas de crecimiento de virus	70
3.3.2.6.	Evaluación del tamaño de placa de lisis.....	70
3.3.3.	Técnicas de manipulación de proteínas	71
3.3.3.1.	Análisis de proteínas en SDS-PAGE	71
3.3.3.2.	Transferencia de SDS-PAGE e inmuno-detección en membrana (Western Blot)	71
3.3.3.3.	Análisis de la expresión de luciferasa en células infectadas <i>in vitro</i>	71

3.3.3.4.	Análisis de intensidad de señal en los ensayos de inmunodetección en membrana.....	72
3.3.4.	Técnicas inmunológicas	72
3.3.4.1.	Determinación de la respuesta inmune específica de células T secretoras de IFN γ por el ensayo de ELISpot.....	72
3.3.4.2.	Análisis de poblaciones celulares en respuesta innata	73
3.3.4.2.1.	Análisis de poblaciones celulares en exudados peritoneales	73
3.3.4.2.2.	Análisis de poblaciones celulares en tumor y bazo.....	75
3.3.5.	Generación de esferoides de células tumorales	75
3.3.6.	Inmunohistoquímica	76
3.3.7.	Manipulación de animales	76
3.3.7.1.	Protocolos de inmunización	76
3.3.7.2.	Obtención de muestras animales	77
3.3.7.3.	Procesado de órganos en el ensayo de biodistribución	78
3.3.8.	Análisis estadístico	78
4.	Resultados	79
4.1.	Generación de virus mutantes de delección y/o recombinantes.	79
4.2.	Análisis del crecimiento de los virus mutantes de delección y/o recombinantes generados.	84
4.2.1.	Análisis del tamaño de placa de los virus mutantes de delección en monocapas celulares.....	84
4.2.2.	Análisis de la capacidad de crecimiento y replicación de los virus recombinantes en distintas líneas celulares.....	85
4.3.	Análisis de la producción de proteína viral y la inducción de apoptosis en los diferentes virus mutantes de delección y/o recombinantes generados.	88
4.4.	Capacidad infectiva de los virus en el modelo <i>ex vivo</i> de esferoides de células tumorales TRAMP-C1.....	90
4.5.	Evaluación de la seguridad <i>in vivo</i> de los virus mutantes de delección.	92
4.6.	Análisis de la capacidad replicativa de los virus <i>in vivo</i>	98

4.7. Efecto de las deleciones sobre la migración de poblaciones de respuesta innata en ratones infectados.	100
4.7.1. Análisis de poblaciones celulares en exudados peritoneales a las 3 hpi.	101
4.7.2. Análisis de poblaciones celulares en exudados peritoneales a las 6 hpi.	102
4.7.3. Análisis de poblaciones celulares en exudados peritoneales a 12 hpi.	104
4.8. Análisis del comportamiento de los virus recombinantes en el modelo singénico murino para la línea tumoral de melanoma B16F10.	106
4.9. Caracterización de los efectos del candidato oncolítico WR- Δ 3-Luc en un contexto tumoral.	112
4.9.1. Análisis de la proliferación tumoral en animales con trasplantes de células B16F10.	113
4.9.2. Análisis de la persistencia de la infección viral en los tumores tratados.	119
4.9.3. Migración de las poblaciones celulares del sistema inmune en ratones con tumores trasplantados en un contexto de infección por vaccinia.	120
4.9.4. Análisis de la respuesta inmune específica inducida en un contexto de infección en tumores de células B16F10.	128
5. Discusión.	131
6. Conclusiones.	147
7. Bibliografía.	148
8. Anexo.	164

Abreviaturas

aa – Aminoácido

AAT – Antígeno Asociado a Tumor

ADN – Ácido desoxirribonucleico

APC – Aloficocianina

APC¹ – “*Adenoidal-Pharyngeal-Conjuntival*”

APC² – Célula presentadora de antígeno

APC-Cy7 – Aloficocianina-cianina 7

ARN – Ácido ribonucleico

ARNm – Ácido ribonucleico mensajero

ATP – Adenosina trifosfato

BCA – Ácido bicinconínico

Bcl-2 – “B-Cell CLL/lymphoma 2”

BSA – Seroalbúmina bovina

CAR – Receptor quimérico de antígeno

CCL- Ligando 3 de la quimioquina con motivo C-C

Célula NK – Célula “*Natural Killer*”

Célula NK – Célula “*Natural Killer T*”

CIK – Células asesinas inducidas por citoquinas

CTLA-4 – Antígeno 4 de linfocitos T citotóxicos

DAB – 3,3' tetrahidrocloruro de diaminobencidina

DAMP – Patrones moleculares asociados a daño

DL₅₀ – Dosis Letal, 50%

DMEM – Medio esencial mínimo de Eagle modificado por Dulbecco

DsRed2 – Proteína roja fluorescente, *Discosoma*

dTDP – Timidina 5'-difosfato

dTMP – Timidina 5'-monofosfato

DTT - Ditioneitol

dTTP – Timidina 5'-trifosfato

EGF – Factor de crecimiento epidérmico

EGFR – Receptor del factor de crecimiento epidérmico

ELISpot – “*Enzyme Linked Immunospot assay*”

FCS – Suero fetal de ternera

FDA – Administración de medicamentos y alimentos

FITC – Isotiocianato de fluoresceína

FLT3L – Ligando de la tirosina quinasa 3 similar a FMS

GAG – Glicosaminoglicano

GFP – Proteína verde fluorescente, *Aequorea victoria*

GM-CSF – Factor estimulante de colonias de granulocitos y monocitos

gp100 – Glicoproteína 100

HA – Hemaglutinina

HER – Receptor del factor de crecimiento epidérmico

HIF-1 – Factor 1 inducible por hipoxia

hpi – Horas post-infección

HRP – Peroxidasa de rábano picante

HSV-1 – Virus herpes simplex 1

i.d. – Intradérmico

i.m. – Intramuscular

i.n. – Intranasal

i.p. – Intraperitoneal

i.t. – Intratumoral

ICAM-1 – Molécula de adhesión intracelular 1

IFM – Intensidad de fluorescencia media

IFN – Interferón

IL – Interleuquina

ITR – Región terminal invertida

kDa – KiloDalton

kpb – Kilo pares de bases

l – Litro

LB – Medio Luria-Bertani

LFA-3 – Antígeno de función asociada a linfocitos 3

LPS – Lipopolisacáridos

Luc – Luciferasa

mA – Miliamperios

mdi – Multiplicidad de infección

mg – Miligramo

MHC – Complejo Mayor de Histocompatibilidad

min – minuto

ml – Mililitro

mM – Milimolar

mm³ – Milímetro cúbico

MVA – Virus Vaccinia Modificado de Ankara

NAT – Neutrófilos Asociados a Tumor

NCS – Suero de ternera recién nacida

ng – Nanogramo

NYCBOH – “*New York City Board Of Health*”

NYVAC – “*New York Vaccinia virus*”

OV – Oncolisis Viral

p/v – Proporción peso/volumen

PAMP – Patrones moleculares asociados a patógenos

PARP – Poli ADP Ribosa Polimerasa

pb – Par de bases

PBS – Tampón fosfato salino

PBS-T – PBS + 0,05% Tween-20

PCR – Reacción en cadena de la polimerasa

PD-1 – Proteína de muerte programada 1

PD-1L – Ligando de proteína de muerte programada 1

PDGFR – Receptor del factor de crecimiento derivado de plaquetas

PE – Ficoeritrina

PE-Cy7 – Ficoeritrina-cianina 7

PHD2 – Dominio 2 de la prolil-hidroxilasa

rpm – Revoluciones por minuto

SDS – Dodecil sulfato sódico

SDS-PAGE – Electroforesis en gel de poliacrilamida con SDS

seg - Segundo

STS – Estaurosporina

TBS – Tampón Tris salino

TBS-T – TBS + 0,01% Tween-20

TCA – Ácido tricloroacético

TCR – Receptor de célula T

TGF- β – Factor de crecimiento transformante beta

TIL – Linfocito infiltrado en tumor

Tim-3 – Proteína que contiene el dominio de mucina e inmunoglobulina de célula T

TK – Timidina kinasa

TNF – Factor de necrosis tumoral

TP53 – Proteína tumoral 53

TRP-2 – Proteína relacionada con la tirosinasa 2

TSP-1 – Trombosponida 1

ua – Unidad arbitraria

ufp – Unidad formadora de placa

URL – Unidad relativa de luz

v/v – Proporción volumen/volumen

VE – Virus Extracelular

VEE – Virus Envuelto Extracelular

VEGF – Factor de crecimiento endotelial vascular

VEGFR – Receptor del factor de crecimiento endotelial vascular

VEI – Virus Envuelto Intracelular

VGF – Factor de crecimiento del virus Vaccinia

VI – Virus Inmaduro

VM – Virus Maduro

VMI – Virus Maduro Intracelular

VVAC – Virus Vaccinia

VVAR – Virus Variola

WR – “*Western Reserve*”

wt – Cepa salvaje

µg – Microgramo

µl – Microlitro

µm – Micrómetro

µM – Micromolar

1. Introducción

1.1. Poxvirus

La familia *Poxviridae* constituye una familia de virus que se divide en 2 subfamilias: *Chordopoxvirinae* (infectan vertebrados), dividida a su vez en 8 géneros (*Orthopoxvirus*, *Parapoxvirus*, *Avipoxvirus*, *Capripoxvirus*, *Leporipoxvirus*, *Suipoxvirus*, *Molluscipoxvirus* y *Yatapoxvirus*); y *Entomopoxvirinae* (infectan insectos), dividida en 3 géneros (*Alphaentomopoxvirus*, *Betaentomopoxvirus* y *Gammaentomopoxvirus*) (Andrew A. Mercer, 2007). En general, las especies dentro de un mismo género se diferencian por sus características biológicas, el rango de hospedador y su distribución geográfica (Esposito *et al.*, 1977a; b).

Los poxvirus son virus de ADN de doble cadena, presentan un genoma de gran tamaño (130-360 kpb), un ciclo replicativo citoplasmático altamente conservado, y un origen evolutivo separado de los demás virus de ADN (Hughes *et al.*, 2010; McFadden, 2005a).

El miembro más notorio de la familia *Poxviridae* es el virus variola (VVAR), el agente causante de la viruela, cuya epidemia tuvo un impacto muy severo en la historia de la humanidad. Esta enfermedad infecciosa fue también la primera y única en ser declarada como erradicada en 1980 por la Organización Mundial de la Salud (Artenstein & Grabenstein, 2008; Smith, 1990).

Asimismo, el virus más estudiado y prototípico de la familia *Poxviridae* es el virus Vaccinia (VVAC) (subfamilia *Chordopoxvirinae*, género *Orthopoxvirus*), que fue el primer virus animal visualizado al microscopio electrónico, crecido en cultivos celulares, purificado físicamente y analizado químicamente (B., 2007), estando las vacunas modernas frente a viruela basadas en cepas atenuadas del virus vaccinia.

1.2. Virus Vaccinia

1.2.1. Estructura y morfología

El virus vaccinia presenta dos tipos distintos de partículas infectivas, el virus maduro (VM) – también conocido como virus maduro intracelular (VMI) – y el virus extracelular (VE) – también conocido como virus envuelto extracelular (VEE) – (**Figura 1**); ambas formas difieren en el tipo de glicoproteínas y proteínas virales presentes en su superficie, y en el número de membranas que las envuelven (McFadden, 2005a; Smith *et al.*, 2002). Dada la alta estabilidad de los VM, se les ha relacionado con su papel en la transmisión entre huéspedes; sin embargo, la fragilidad de la membrana externa presente en los VE apunta a su papel en la propagación de la infección dentro del mismo hospedador (Moss, 2012).

Además de estos dos tipos de partículas infectivas, existen otras dos formas de partículas virales intermedias: el virus envuelto intracelular (VEI), un VM que ha adquirido una envuelta adicional con la membrana derivada del aparato de Golgi; y el virus envuelto asociado a la célula, VEI asociado a membrana, como paso previo a su liberación al medio extracelular como VE o a la inducción de polimerización de colas de actina para su proyección hacia células adyacentes (McFadden, 2005a).

Un estudio detallado de las partículas virales muestra que las partículas tienen forma de ladrillo, con unas dimensiones de 360 x 270 x 250 nm (**Figura 1**). Así, los VM presentan una capa exterior de unos 8 nm junto a una membrana lipídica (de unos 5 nm de grosor), bajo la que se ubican dos cuerpos laterales de material heterogéneo sin estructura aparente; rodeando el núcleo se encuentra una empalizada de unos 18 nm de grosor que contiene poros que dan acceso al “core”, donde se localizan proteínas virales estructurales, el ADN genómico y enzimas transcripcionales asociadas (Cyrklaff *et al.*, 2005; Hollinshead *et al.*, 1999; Munyon *et al.*, 1967). A diferencia del VM, los VE presentan además una membrana extra derivada de la red del trans-Golgi que presenta proteínas virales y celulares (ausentes en los VM) (Andrew A. Mercer, 2007; Smith *et al.*, 2002).

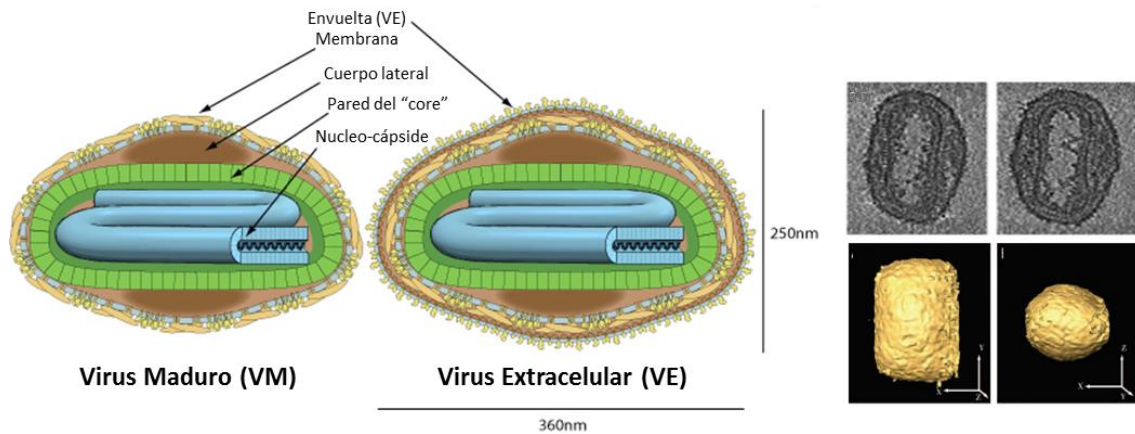


Figura 1. Partículas infectivas de Poxvirus. Panel izquierdo: Estructura del virus maduro (VM) y del virus extracelular (VE) (Adaptado de “© ViralZone 2016, Swiss Institute of Bioinformatics”). Panel derecho: Secciones por criomicroscopía electrónica (imágenes superiores) y representación volumétrica (imágenes inferiores) de una partícula de VM mediante reconstrucción tomográfica (Adaptada de Cyrklaff y cols 2005).

1.2.2. Organización genómica

El virus vaccinia presenta un genoma constituido por una molécula lineal de ADN de doble cadena, cuyo tamaño varía en función de la cepa de virus, oscilando alrededor de las 200 kpb y un tamaño de 62,3 μm (Esteban *et al.*, 1977). En los extremos de la molécula de ADN se localizan unas estructuras en forma de horquilla cerradas covalentemente mediante regiones de repeticiones en tándem llamadas regiones terminales invertidas (de las siglas en inglés: “*Inverted Terminal Repeat*” - ITR) (Goebel *et al.*, 1990) (la longitud de las ITR también varía en función de la cepa de virus); la presencia de estas regiones terminales repetidas destaca por su importancia en la replicación del ADN viral (Merchlinisky, 1990; Merchlinisky & Moss, 1989) (**Figura 2**).

El genoma viral presenta un contenido rico en A+T, se encuentra asociado a proteínas virales adoptando una conformación superenrollada, y contiene un número muy reducido de espacios intergénicos y regiones no codificantes (Esteban *et al.*, 1977; Goebel *et al.*, 1990; Soloski & Holowczak, 1981).

El criterio utilizado para nombrar las pautas de lectura abierta en los *Orthopoxvirus* está basado en la conservación de la distribución de los sitios de restricción de la enzima *Hind* III en la región central del genoma. Según dicho criterio, a cada pauta de lectura se

le asigna la letra del fragmento de ADN en el que se encuentre tras la digestión del genoma con *Hind* III (letras asignadas de izquierda a derecha) seguido del número que ocupa dicha pauta de lectura dentro del fragmento y de la letra “L” (*left*) o “R” (*right*) dependiendo de la dirección de transcripción del gen (Moss, 2007).

La región central del genoma del virus vaccinia es la más conservada y en ella se localizan los genes implicados en funciones esenciales relacionadas con la replicación o el ensamblaje viral, mientras que en las regiones terminales se encuentran genes no esenciales relacionados con la interacción con la célula hospedadora y con mecanismos de evasión de la respuesta inmune, y que muestran una mayor variabilidad entre cepas de virus (Gubser *et al.*, 2004; Moss, 2007; Upton *et al.*, 2003) (**Figura 2**).

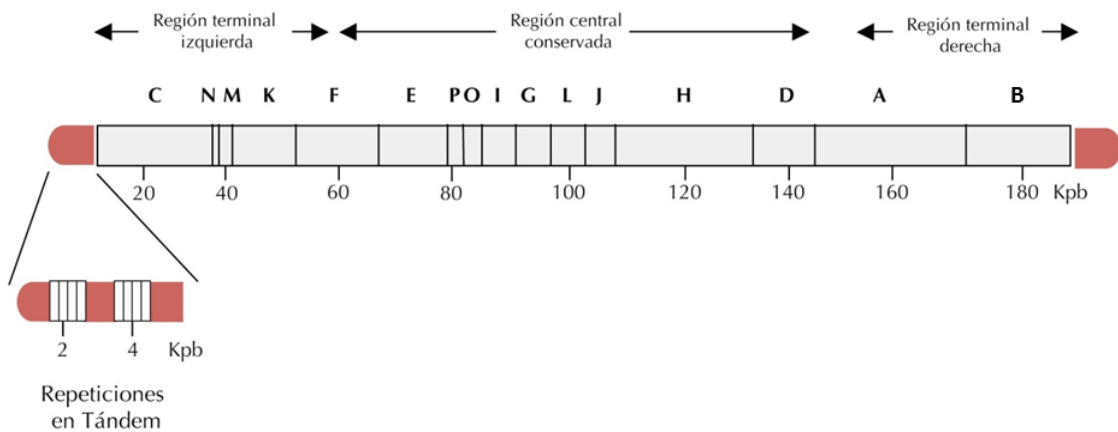


Figura 2. Estructura y organización del genoma del virus vaccinia.

1.2.3. Ciclo infeccioso de VVAC (Entrada, desensamblaje, expresión génica y replicación del ADN, morfogénesis y salida)

El virus vaccinia, al igual que otros poxvirus, presenta un amplio tropismo tisular, y su ciclo replicativo tiene lugar íntegramente en el citoplasma de la célula infectada, lo que le confiere cierta independencia de la maquinaria celular para llevar a cabo y completar su replicación al codificar además una serie de factores de transcripción y enzimas de replicación y transcripción virales (McFadden, 2005a). El ciclo infeccioso del virus vaccinia se divide en 4 etapas: entrada, desensamblaje, expresión génica y replicación del ADN, y morfogénesis y salida de la progenie viral (**Figura 3**).

-Entrada (**Figura 3 (1)**)

Inicialmente, se ha de tener en cuenta que existen dos formas virales infecciosas (VM y VE) que presentan distinto número de membranas, y distinta composición de proteínas virales en ellas (Smith *et al.*, 2002). La entrada de los virus se puede producir por fusión directa de la membrana viral con la membrana plasmática, o por macropinocitosis y posterior liberación en endosomas acidificados (Moss, 2012). En el proceso de entrada del virus mediante fusión, se ha descrito un conjunto de 9 proteínas virales implicadas que se denomina “complejo de entrada por fusión”; asimismo también existen otras proteínas virales asociadas a membrana en el VM que facilitan la unión de los viriones a glicosaminoglicanos (GAG) (A27, D8 y H3) o a laminina (A26) en la superficie de la membrana plasmática celular (Andrew A. Mercer, 2007; Moss, 2012). Como paso previo a la entrada por fusión, en el caso del VE, al presentar una membrana adicional, la envuelta exterior es eliminada por un mecanismo no fusogénico que requiere proteínas de superficie celulares y virales (estando implicadas los GAGs en la membrana plasmática celular y las proteínas virales A34 y B5) (Law *et al.*, 2006).

-Desensamblaje (**Figura 3 (2)**)

A continuación, tiene lugar el transporte mediado por microtúbulos de los elementos del “core” hacia la factoría viral en formación (Carter *et al.*, 2003), donde se lleva a cabo un proceso de desensamblaje caracterizado, en una primera etapa, por la pérdida de lípidos y proteínas del virión (Dales, 1965) y, en una segunda etapa, por una mayor accesibilidad del genoma a la acción de las nucleasas de ADN exógenas (Sarov & Joklik, 1972).

-Expresión génica y replicación del ADN (**Figura 3 (3)**)

Uno de los primeros eventos que tienen lugar en el citoplasma es la transcripción, un proceso estrictamente regulado que tiene lugar en tres etapas sucesivas: temprana, intermedia y tardía, controladas por distintos factores de transcripción y secuencias de promotor. Así, la transcripción temprana tiene lugar pocos minutos después de la entrada del virus en la célula y utiliza las enzimas, factores de iniciación y factores de terminación empaquetados en el “core” del virus (Andrew A. Mercer, 2007); la transcripción temprana tiene como resultado la síntesis del ARNm de alrededor de la mitad del genoma del virus; ARNm que codifican proteínas que intervienen en la

modulación de la respuesta antiviral de la célula, la replicación del ADN y la transcripción de genes intermedios. La transcripción intermedia tiene lugar de forma simultánea a la replicación del ADN (Vos & Stunnenberg, 1988); los genes intermedios codifican factores de transcripción tardíos (Keck *et al.*, 1990). En último lugar, se lleva a cabo la transcripción tardía de genes que codifican proteínas estructurales, factores de virulencia, y enzimas que serán empaquetados en los nuevos viriones.

La replicación del ADN viral tiene lugar en regiones del citoplasma llamadas factorías virales, y ocurre durante las dos primeras horas de infección (Salzman, 1960). El proceso de replicación se inicia por la generación de un corte en una de las cadenas, dejando un extremo 3' libre para iniciar la incorporación de desoxirribonucleótidos. La molécula replicada de ADN se vuelve sobre sí misma al alcanzar la horquilla terminal para copiar el genoma restante. De este modo, se forman grandes concatémeros ramificados a través del bucle terminal, que serán resueltos tras la etapa de la transcripción de genes tardíos generándose moléculas lineales de ADN viral con los extremos sellados y con secuencias invertidas y complementarias (Traktman, 1991). El ADN así producido se acumula en las factorías para ser posteriormente empaquetado y dar lugar a la formación de la progenie viral; se ha estimado que se producen unas 10000 copias del genoma viral, y que alrededor del 50% son empaquetadas en viriones (Joklik & Becker, 1964).

-Morfogénesis y salida de la progenie viral (**Figura 3 (4)**)

Finalmente tiene lugar el proceso de morfogénesis; así, en el proceso de formación de las partículas infecciosas se dan una serie de estadios intermedios que incluyen la adquisición final de las membranas de los VM y los VE. Este proceso se inicia en la factoría viral y comienza con la formación de crestas membranosas compuestas por proteínas virales y lípidos de la célula hospedadora, que engloban al complejo ADN/proteína viral dando como resultado unas formas esféricas denominadas virus inmaduros (VI). A continuación, tiene lugar el procesamiento proteolítico de alguna de las proteínas virales y la condensación del “core” para dar lugar a la primera forma infectiva del virus vaccinia: los virus maduros (VM); la mayor parte de los VM permanecen en el citoplasma celular hasta que se liberan tras la lisis de la célula infectada. Sin embargo, una pequeña fracción de estos VM son transportados por medio de microtúbulos hasta el trans-Golgi, sitio en el que adquieren una segunda membrana

formándose los virus envueltos intracelulares (VEI); a continuación, estos virus son transportados por microtúbulos hasta la membrana plasmática, donde se produce la fusión de la membrana más externa del virus con la membrana plasmática y se liberan los VE al medio extracelular o se proyectan mediante colas de actina hasta células adyacentes (Andrew A. Mercer, 2007; Blasco & Moss, 1991; Liu *et al.*, 2014).

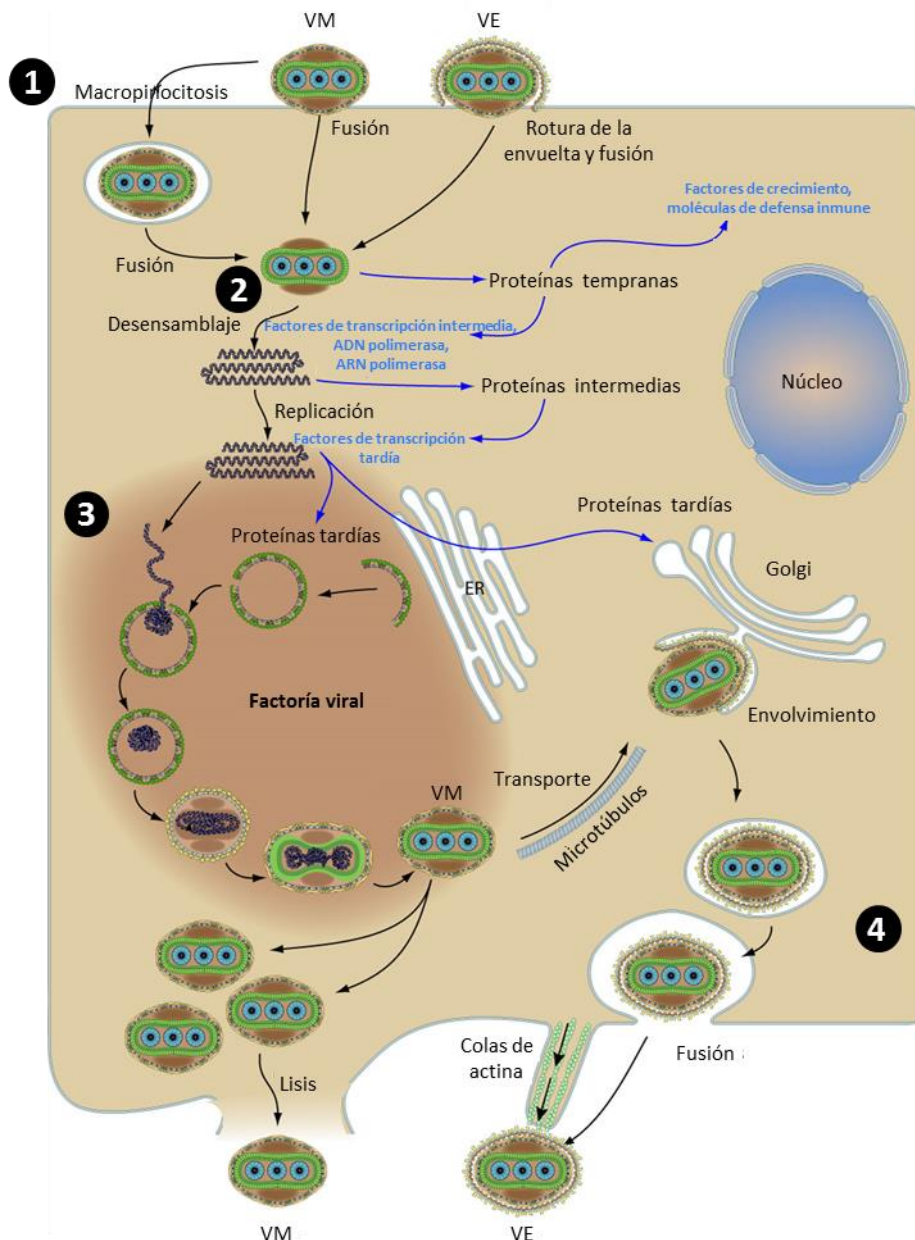


Figura 3. **Ciclo infeccioso del virus vaccinia.** En el esquema se muestra el proceso completo de infección del virus, que se encuentra dividido en: Entrada (1), Desensamblaje (2), Transcripción y replicación (3), y Morfogénesis y salida de la

progenie viral (4). En la figura se muestran los virus maduros (VM) y los virus extracelulares (VE). Figura adaptada de “© ViralZone 2016, Swiss Institute of Bioinformatics”.

1.2.4. El virus vaccinia y su aplicación como vector vacunal

Tal y como se ha mencionado anteriormente, cepas atenuadas del VVAC se han utilizado en el pasado como vacunas frente al virus causante de la viruela (VVAR), para conseguir su completa erradicación. Adicionalmente, y gracias a la tecnología del ADN recombinante, el VVAC también se ha utilizado como vector vacunal frente a otros patógenos (Moss, 1991), mediante la inserción de antígenos heterólogos y genes involucrados en la regulación de la respuesta inmune, y la delección de genes virales inmuno-moduladores dando como resultado un aumento en la atenuación del vector o una mejora en su inmunogenicidad (Moss, 1996; Paoletti, 1996). Entre las cepas atenuadas del virus vaccinia más utilizadas y estudiadas se encuentran MVA (del inglés “*Modified Virus Ankara*”) y NYVAC (del inglés “*New York VACCinia virus*”) (Stickl & Hochstein-Mintzel, 1971; Tartaglia *et al.*, 1992). De esta forma, se han venido desarrollando multitud de candidatos vacunales basado en poxvirus frente a enfermedades infecciosas (ya sean causadas por virus, bacterias o parásitos) o cáncer (Sanchez-Sampedro *et al.*, 2015), mostrando resultados prometedores, no sólo a nivel preclínico sino en ensayos clínicos en humanos.

Así, el objetivo del presente trabajo se centra en la optimización del virus vaccinia para su adecuación como vector oncolítico a usar en terapia frente a tumores.

1.3. Cáncer

1.3.1. La enfermedad en cifras

El cáncer es un complejo de enfermedades caracterizado por una desregulación de los mecanismos implicados en la división y control de muerte celular, que desemboca en un crecimiento descontrolado que puede afectar múltiples órganos y tejidos. Este complejo de enfermedades constituye actualmente uno de los principales problemas sanitarios a nivel mundial. Según el informe mundial sobre cáncer del año 2014 de la Organización Mundial de la Salud (basado en los datos mundiales obtenidos en el proyecto

GLOBOCAN 2012), el cáncer es una de las principales causas de morbilidad y mortalidad, con alrededor de 14 millones de nuevos casos anuales (ratio de 182/100000 personas) y hasta 8 millones de muertes asociadas a cáncer anuales (ratio de 102/100000 personas) afectando a poblaciones de todos los países y regiones del mundo (**Figura 4**); en esta misma dirección, si continúa la progresión vista hasta la actualidad, se estima que los nuevos casos de cáncer aumentarán un 70% en las próximas dos décadas. La incidencia tiene una relación directa con la edad, pasando de un ratio de 10/100000 en el grupo más joven (0-14 años) hasta 500/100000 en el grupo de mayor edad (60-64 años). Entre la población masculina, los casos de cáncer con mayor incidencia son: pulmón (16,7%), próstata (15%), colon y recto (10%), estómago (8,5%) e hígado (7,5%); mientras que entre la población femenina destacan: mama (25,2%), colon y recto (9,2%), pulmón (8,7%), cérvix (7,9%) y estómago (4,8%). Asimismo, en cuanto a su distribución mundial, más del 60% de los casos de cáncer ocurren en África, Asia y América del sur y central, regiones en las que se presenta un porcentaje de muertes relacionadas con cáncer del 70%. El cáncer encuentra sus causas en un conjunto de variables como son, entre otros, la edad, el componente genético asociado, factores del medio ambiente, la dieta y actividad física, así como la presencia de agentes infecciosos relacionados con la inducción de cáncer (WILD, 2014).

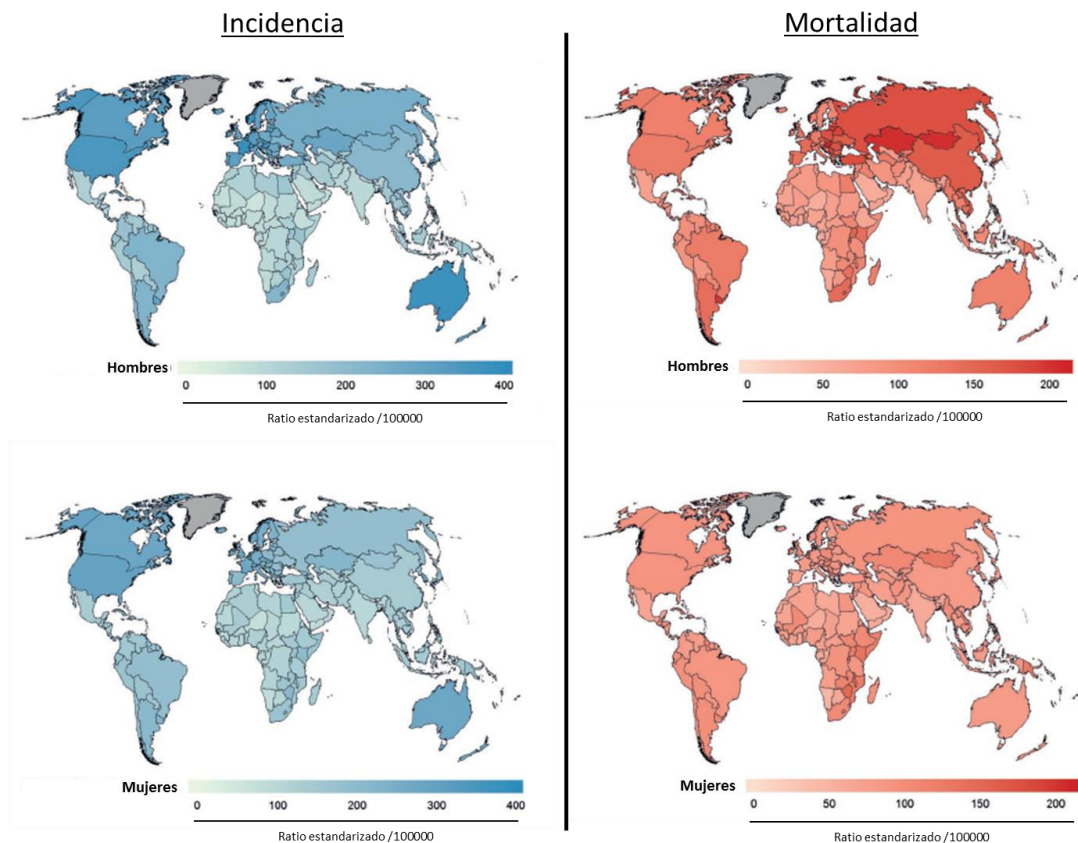


Figura 4. **Representación a nivel mundial de las proporciones de incidencia y mortalidad de cáncer, en hombres y en mujeres.** Los ratios expresan los valores (compensados por edad) por cada 100000 personas.

1.3.2. Tratamiento

El primer factor determinante del éxito frente al cáncer se encuentra en el diagnóstico precoz del mismo, dado que la prognosis suele ser más favorable cuanto más temprana sea su detección. En este sentido, se están logrando numerosos avances en las técnicas de análisis de imagen, en el estudio de marcadores tumorales directos e indirectos que puedan relacionarse con la incidencia de tumores, y en las plataformas de secuenciación genética que permiten establecer relaciones entre marcadores genéticos y prognosis o tratamientos específicos basándose en el desarrollo de bases de datos que hacen accesible la información disponible sobre los avances realizados en laboratorio y en clínica (Ludwig & Weinstein, 2005; Neal *et al.*, 2015; Rabin *et al.*, 2013).

De forma clásica, las principales medidas para el tratamiento del cáncer son la cirugía, la quimioterapia, la radioterapia, así como combinaciones entre ellas. La elección del

tipo de terapia debe ajustarse a cada paciente, tipo de tumor y estadio en el que se encuentre (Ludwig & Weinstein, 2005).

Además de estas medidas, actualmente se están posicionando nuevas terapias como sólidos tratamientos de apoyo a los habitualmente empleados. Estos tratamientos se basan en el uso de distintas estrategias, que incluyen la utilización de:

-Moléculas inhibidoras: Diversos tratamientos hacen uso de inhibidores de cascadas de señalización des-reguladas en tumores, e implicadas en la proliferación tumoral o en la interacción de las células tumorales con los tejidos de soporte. Entre estas moléculas inhibidoras se pueden destacar: *Afatinib* (inhibidor de EGFR, HER-2 y HER-4; utilizado para tratar cáncer de pulmón), *Axitinib* (inhibidor de VEGFR y PDGFR; usado para tratar carcinoma de células renales), o *Vemurafenib* (inhibidor de 'V600E' BRAF –serín/treonin proteín quinasa; empleado para el tratamiento de melanoma)(Ascierto *et al.*, 2012; Modjtahedi *et al.*, 2014; Motzer *et al.*, 2013).

-Anticuerpos monoclonales específicos de tumores: En este caso se hace uso de la alta especificidad que proporcionan los anticuerpos frente a las distintas dianas, que actúan de forma similar a como lo hacen los inhibidores, pero que además pueden actuar modificando las interacciones tumor-estroma, contrarrestando los efectos inmunomoduladores del microambiente tumoral, o mediando la actividad anti-tumoral a través de citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos, fagocitosis o citotoxicidad dependiente del complemento. Ejemplos representativos de este tipo de tratamientos son: *Trastuzumab* (une HER-2; se emplea en el tratamiento de cáncer de mama y en adenocarcinoma gástrico), *Rituximab* (une CD20; empleado para tratar linfoma no-Hodgkin) o *Bevacizumab* (une VEGF; usado para el tratamiento de cáncer colorrectal, de pulmón, glioblastoma y adenocarcinoma renal) (Galluzzi *et al.*, 2012; Makkouk & Weiner, 2015).

-Anticuerpos monoclonales que bloquean puntos de control del sistema inmune: Uno de los fenómenos que se observan en el microambiente inmuno-supresivo tumoral es la presencia de marcadores como CTLA-4, PD-1 o Tim-3 en la superficie de los linfocitos infiltrados en tumor que conduce a un fenotipo de linfocitos exhaustos, aprovechando así los mecanismos del sistema inmune para evitar la autoinmunidad en condiciones normales. De esta forma, la existencia de anticuerpos monoclonales que bloquean la interacción entre los receptores y ligandos que evitan permanecer activos a

los linfocitos específicos infiltrados en el tumor, se presenta como una alternativa que puede mejorar la respuesta inducida frente a tumores (Funt *et al.*, 2014; Makkouk & Weiner, 2015; Suzuki *et al.*, 2016). Un ejemplo de este tipo de anticuerpos es *Ipilimumab*, un anticuerpo monoclonal aprobado en 2011 por la FDA que se une a CTLA-4 y ha demostrado una mejora de la supervivencia en pacientes con melanoma (Hodi *et al.*, 2010).

-Potenciadores de la activación de linfocitos T: En esta sección se engloban aquellas moléculas capaces de actuar como desencadenantes de señales co-estimuladoras y de activación de linfocitos T en tumor (por ejemplo IL-2, IL-15, CD-40, 4-1BB o anticuerpos monoclonales) (Vacchelli *et al.*, 2012; Wolchok *et al.*, 2010).

-Transferencia de linfocitos T autólogos: Este tratamiento se basa en la extracción y aislamiento de linfocitos infiltrados en tumor (TIL, del inglés “*Tumor-Infiltrating lymphocytes*”) de biopsias de pacientes con cáncer (en determinados casos, los TIL se pueden seleccionar por la especificidad del receptor de célula T -TCR-); a continuación se expanden *ex vivo* en presencia de factores de crecimiento (pudiendo activarse también añadiendo inmuno-estimuladores específicos –antígenos tumorales– o no específicos), y se re-introducen en los pacientes (Aranda *et al.*, 2014; Rosenberg *et al.*, 1994). Otra de las alternativas propuestas, consisten en modificar las células T extraídas para que expresen receptores de antígenos quiméricos (CAR, del inglés “*Chimeric Antigen Receptor*”), compuestos por un dominio de señalización de TCR fusionado a una región determinante de la complementariedad derivada de un anticuerpo para de esta forma dirigir los linfocitos autólogos en el paciente hacia las poblaciones tumorales diana (Aranda *et al.*, 2014; May *et al.*, 2012).

-Vacunas: Otra de las características de los tumores es la de promover una tolerancia inmune frente a los antígenos sobreexpresados en ellos (dado que son proteínas autólogas), que se ve reforzada por el contexto inmuno-supresivo tumoral. Esta tolerancia constituye uno de los principales desafíos a la hora de inducir una respuesta inmune específica frente a antígenos asociados a tumor (AAT). Para abordar este problema, el empleo de vacunas constituye una alternativa factible que, a su vez, presenta una amplia variedad de estrategias: 1) Vacunas profilácticas que previenen la infección con agentes que pueden causar cáncer, como es el caso del virus del papiloma humano y las vacunas *Cervarix* ® y *Gardasil* ® (Lee *et al.*, 2016). 2) Vacunas

terapéuticas que emplean células tumorales completas que constituyen una fuente más diversa de AAT, un ejemplo puede ser *GVAX* (dos líneas celulares irradiadas de cáncer de próstata que secretan GM-CSF) (Chiang *et al.*, 2011; Lipson *et al.*, 2015; Xue *et al.*, 2016). 3) Vacunas de células dendríticas presentando AAT; de esta forma se emplean precursores autólogos del paciente para generar las células dendríticas *ex vivo*, las células se incuban con AAT, péptidos o se modifican para expresar un AAT, y finalmente se re-introducen en el paciente; un ejemplo de estas vacunas es *Sipuleucel-T* (células dendríticas incubadas con la proteína de la fosfatasa ácida prostática junto con GM-CSF) (Gulley *et al.*, 2016). 4) Vacunas basadas en AAT o péptidos, que funcionan mediante la administración de antígenos sobreexpresados en tumor (en combinación con adyuvantes o moléculas co-estimuladoras), o mediante unión directa de péptidos a las moléculas del complejo mayor de histocompatibilidad (MHC) en las células dendríticas y la consecuente activación de los linfocitos T (sin necesidad de un procesamiento antigénico previo) (Makkouk & Weiner, 2015; Schuster *et al.*, 2011; Schwartzenuber *et al.*, 2011). 5) Vacunas que emplean vectores virales como plataformas de expresión de AAT; de esta forma se aprovecha la capacidad *per se* de estimular una respuesta inmune (celular y/o humoral) que presenta la infección con virus, para romper la inmuno-tolerancia hacia los antígenos tumorales e inducir una respuesta inmune específica; un ejemplo es *TroVax* (una vacuna basada en la cepa atenuada MVA del virus vaccinia, que codifica el antígeno oncofetal humano 5T4) (Harrop *et al.*, 2013; Rowe & Cen, 2014).

-Terapia empleando virus oncolíticos: Ésta estrategia utiliza virus que muestran especificidad de infección/replicación en tumores o que han sido modificados para restringir su capacidad replicativa en contextos diferentes al tumoral; de esta forma se aprovechan las características del microambiente tumoral para que la infección viral produzca la lisis de las células tumorales (Lichty *et al.*, 2014). Esta estrategia se explicará más detalladamente a continuación y formará parte del objetivo del presente trabajo.

1.4. Oncolisis viral

La oncolisis viral, tal y como se ha apuntado anteriormente, se basa en el empleo de virus replicativos que presentan la habilidad de infectar de forma selectiva o restringida y lisar células tumorales, mientras que su infección no afecta a tejidos sanos;

presentando además la capacidad de inducir el reclutamiento de células inflamatorias del sistema inmune y de exponer los AAT a las células infiltradas para estimular la generación de una respuesta inmune específica anti-tumoral.

1.4.1. Historia de la oncolisis viral

El concepto de oncolisis viral nació de la observación de los requerimientos para una propagación viral efectiva y de las características propias que definen la malignización de una célula y el establecimiento del tumor; así, comenzaron a documentarse casos en los que se relacionaba la infección natural con algunos virus con la regresión tumoral en pacientes: en 1896 se describió la regresión parcial de la leucemia en una mujer presumiblemente infectada con virus influenza (Dock, 1904), o la regresión parcial de la leucemia en un niño tras padecer varicela (Bierman *et al.*, 1953). De esta forma, la comunidad científica empezó a centrar su atención en el uso de virus para el tratamiento de tumores. Los primeros estudios clínicos en este sentido aparecen durante la década de 1950 empleando el virus de la hepatitis para tratar la enfermedad de Hodgkin (Hoster *et al.*, 1949), empleando el flavivirus “*Egypt 101*” (West Nile) para el tratamiento de la enfermedad neoplásica avanzada (Southam & Moore, 1952), o el virus APC¹ (del inglés “*Adenoidal-Pharyngeal-Conjuntival*”) (conocido actualmente como adenovirus) para tratar cáncer de cérvix (Georgiades *et al.*, 1959). A partir de este momento, gracias al descubrimiento y caracterización un nuevos virus, y al avance en las técnicas de crecimiento de virus en células en cultivo y su posterior aislamiento, se produjo un aumento en el número de virus patógenos investigados para su potencial utilización en el tratamiento de tumores (Kelly & Russell, 2007). Asimismo, y gracias al avance en paralelo en la década de 1990 del campo de la virología, de la ingeniería genética y del conocimiento acerca del comportamiento de los tumores y el sistema inmune, se pudo comenzar a desarrollar de un modo racional virus oncolíticos más seguros y con un perfil de replicación más restringido (Kelly & Russell, 2007).

1.4.2. Bases de la oncolisis viral

El éxito de la oncolisis viral reside en el punto de encuentro entre las necesidades que presenta un virus para su crecimiento y las características que presenta el contexto tumoral para su proliferación. De esta forma, actualmente se empieza a comprender la complejidad que presenta un microambiente tumoral, en el cual además de producirse la malignización de las células del tejido, se producen una serie de cambios que favorecen

y aseguran el desarrollo tumoral frente a los mecanismos naturales para contrarrestarlo; a estas cualidades que caracterizan a los tumores se les han denominado “Marcas distintivas del cáncer”, y constituyen un principio organizativo para la racionalización de la complejidad de los tumores (Hanahan & Weinberg, 2011). Son estas marcas distintivas del cáncer las que proporcionan a los virus un recurso del que obtener ventaja, y las que sientan las bases del uso de virus como agentes oncolíticos frente a tumores.

1.4.3. Marcas distintivas del cáncer

Las marcas distintivas del cáncer engloban un conjunto de características, diferentes y complementarias, que permiten el crecimiento y la diseminación tumoral. Estas características se encuentran presentes no sólo en células tumorales, sino que también participan de alguna de ellas las células del estroma asociado a tumor y algunas células del sistema inmune (**Figura 5**).



Figura 5. **Marcas distintivas del cáncer.** Se presentan las características que engloban los principales aspectos diferenciados del micro-ambiente tumoral; estas características se presentan como habilitadoras del desarrollo tumoral y como elementos implicados en el mantenimiento, escape y adaptación de las poblaciones celulares en los tumores. (Adaptada de Hanahan and Weinberg, 2011).

Se ha propuesto una división de las marcas distintivas del cáncer en 10 clases (Hanahan & Weinberg, 2011):

-Señalización sostenida de proliferación: Ésta es una de las características fundamentales en el desarrollo tumoral, y se basa en la alteración de los mecanismos de control que regulan el crecimiento y división en tejidos normales. De esta forma, la señalización mitogénica en células cancerígenas encuentra mecanismos para atajar la

regulación mediante la producción de factores de crecimiento propios (estimulación proliferativa endocrina), la estimulación de las células del estroma asociado a tumor para que éstas produzcan los factores de crecimiento, el incremento en el número de receptores de factores de crecimiento en la membrana plasmática, el aumento de la sensibilidad de estos mismos receptores, o la independencia de los factores de crecimiento mediante mutaciones que provoquen un estado de activación constitutiva en los componentes intracelulares a los que activa el complejo ligando-receptor de los factores de crecimiento (Lemmon & Schlessinger, 2010; Witsch *et al.*, 2010).

-Evasión de supresores de crecimiento: Junto con el punto anterior, otro de los mecanismos celulares existentes para el control de la proliferación celular son las señales supresoras del crecimiento. Dichas señales en los tejidos tumorales se encuentran alteradas debido a mutaciones que afectan a la función de los supresores tumorales (como la proteína asociada a retinoblastoma o la proteína TP53), al mecanismo de inhibición por contacto, o a la actividad de la ruta de señalización de TGF- β (conocido tanto por sus efectos anti-proliferativos como por su relación con la transición epitelio-mesénquima en tumores) (Hanahan & Weinberg, 2011).

-Resistencia a la muerte celular: En este caso, el efecto regulatorio recae sobre los mecanismos que inducen la muerte celular, encontrándose en el contexto tumoral afectada la apoptosis (mediante la pérdida de función de la proteína TP53, el aumento de la expresión de reguladores anti-apoptóticos o señales de supervivencia, la reducción de la expresión de factores pro-apoptóticos, o afectando a intermediarios en las rutas de activación de apoptosis), y regulada la actividad de la autofagia y la necrosis para obtener los beneficios derivados de sus efectos transitorios, como la optimización metabólica o la estimulación del crecimiento (Hanahan & Weinberg, 2011).

-Permitir la inmortalidad replicativa: Esta característica responde al problema que se presenta cuando se produce un evento de replicación constitutiva, y éste es la erosión de los extremos de los cromosomas. De esta forma, la expresión funcional de la enzima telomerasa en gran parte de los tumores ayuda a evitar los efectos derivados de la inestabilidad genética: senescencia y apoptosis. Además, el contexto tumoral puede beneficiarse de las nuevas funciones (independientes del mantenimiento de los telómeros) que se le están atribuyendo a la telomerasa en cuanto a su participación en la

proliferación celular, la resistencia a la apoptosis o la reparación del ADN dañado (Hanahan & Weinberg, 2011).

-Inducir angiogénesis: Mediante esta inducción, los tumores pueden proveerse del oxígeno y los nutrientes necesarios para su proliferación, así como eliminar los desechos metabólicos y el dióxido de carbono, además de proporcionar la capacidad de pasar al torrente sanguíneo e invadir otros tejidos. La vascularización en tumores está principalmente mediada por la regulación de VEGF-A (factor inductor de angiogénesis) y de la trombospondina 1 (TSP-1), y la colaboración con pericitos (células de soporte) y con células progenitoras vasculares (derivadas de médula ósea) (Hanahan & Weinberg, 2011).

-Activar la invasión y la metástasis: Esta característica engloba un amplio conjunto de componentes y mecanismos que median la expansión tumoral hacia otros tejidos sanos: la regulación de la expresión de factores de transcripción involucrados en la transición epitelio-mesénquima (células epiteliales transformadas pueden adquirir la habilidad de invadir, resistir la apoptosis y diseminarse (Polyak & Weinberg, 2009)), la posible colaboración con células del estroma (Egeblad *et al.*, 2010), o la invasión de células inflamatorias que liberan al medio enzimas que pueden degradar la matriz extracelular y factores que median el crecimiento invasivo (Qian & Pollard, 2010).

-Inestabilidad en el genoma y mutación: Ésta es una de las características identificadas como habilitadora, ya que la adquisición de mutaciones aleatorias o reordenamientos cromosómicos permiten aumentar la capacidad de adaptación de los tumores a los potenciales entornos desfavorables (Hanahan & Weinberg, 2011).

-Promover la inflamación: Se clasifica como otra de las características habilitadoras y se basa en la infiltración de células inflamatorias de respuesta innata y adaptativa frente al tumor y en el efecto pro-tumoral que este contexto inflamatorio puede tener (DeNardo *et al.*, 2010); así, la inflamación puede contribuir mediante el aporte de factores de crecimiento y pro-angiogénicos, enzimas para la modificación de la matriz extracelular, señales de activación de la transición epitelio-mesénquima, o liberación de especies reactivas de oxígeno (Grivennikov *et al.*, 2010; Qian & Pollard, 2010).

-Desregulación energética: En este caso se produce una reprogramación del metabolismo energético celular de la mayoría de tejidos normales para poder mantener el crecimiento y proliferación continuados característicos de los tumores. Una de las adaptaciones que se pueden producir es el efecto Warburg (metabolismo desplazado hacia la ruta glicolítica aún en presencia de oxígeno), gracias al cual se especula que puede producirse un aumento de intermediarios de la glicolisis que pueden emplearse para la generación de nucleósidos y aminoácidos que, a su vez, pueden ser utilizados para la producción de macromoléculas y orgánulos para la generación de nuevas células) (Vander Heiden *et al.*, 2009). Asimismo, también se ha descrito la presencia de poblaciones de células tumorales con distinto perfil metabólico de forma que unas poblaciones puedan aprovechar los desechos metabólicos de las otras, y así obtener un rendimiento energético optimizado (Feron, 2009).

-Evitar la destrucción por parte del sistema inmune: Este apartado hace referencia al entorno inmuno-supresivo que presentan los tumores y gracias al cual son capaces de contrarrestar la respuesta inmune antitumoral innata y adaptativa. De esta forma, las células tumorales se valen del uso de citoquinas y quimioquinas para modificar la infiltración de linfocitos T y células NK, disminuyen las moléculas co-estimuladoras en su membrana plasmática para evitar la activación de los linfocitos T específicos (CD28:B7), expresan o inducen la expresión en linfocitos T de moléculas inhibitoras de la activación (CTLA-4:B7 o PD-1:PD-L1), o se valen del fenotipo pro-tumoral que adquieren algunas células en el contexto tumoral (células del estroma asociado a tumor, fibroblastos asociados a tumor, células T reguladoras, macrófagos asociados a tumor, neutrófilos asociados a tumor o células supresoras derivadas mieloides) (Gajewski *et al.*, 2013; Hanahan & Weinberg, 2011; Liu & Zeng, 2012).

1.4.4. Mecanismo de acción de la oncolisis viral

El principal componente de la viroterapia oncolítica es la infección masiva de las células tumorales y su consecuente lisis. Tal y como se ha descrito en el apartado anterior, los tumores presentan un complejo microambiente que les permite contrarrestar o regular a su favor los mecanismos anti-tumorales naturales; la estrategia de la oncolisis viral se centra en sacar provecho de este microambiente para tratar los tumores, empleando virus modificados que presentan un tropismo restringido principalmente a este contexto tumoral. De esta forma, los virus replicativos se

presentan como seguros en tejidos normales (dada su inhabilidad de infectarlos, la carencia de los mecanismos que median las contramedidas virales frente a la respuesta antiviral celular o por parte del sistema inmune, o dada la carencia de los mecanismos involucrados en el correcto desarrollo de la infección), mientras que pueden infectar y propagarse en el tejido tumoral aprovechando características como la evasión del sistema inmune (evita la eliminación de la infección viral mediada por el sistema inmune en el tumor), la proliferación celular sostenida (asegura las moléculas y metabolitos necesarios para la replicación viral), la regulación de la apoptosis (permite el curso normal de la infección en la célula evitando la muerte celular) o la angiogénesis (la vascularización del tumor permite una mayor dispersión de los virus en el tumor) (Kirn & Thorne, 2009; Lichty *et al.*, 2014).

De esta forma los virus oncolíticos pueden actuar mediante la lisis directa de las células tumorales (con la consecuente liberación al medio extracelular de componentes de células tumorales entre los que se encuentran los AAT), mediante la infección de los fibroblastos asociados a tumor y de las células que conforman los capilares sanguíneos que irrigan el tumor (causando así un colapso vascular que favorecerá la terapia al limitar el influjo de nutrientes y oxígeno hacia el tumor) (Breitbach *et al.*, 2007), y mediante la respuesta innata y adaptativa derivada de la infección viral del tejido tumoral y de las células del estroma asociado al tumor (**Figura 6**) (Keller & Bell, 2016).

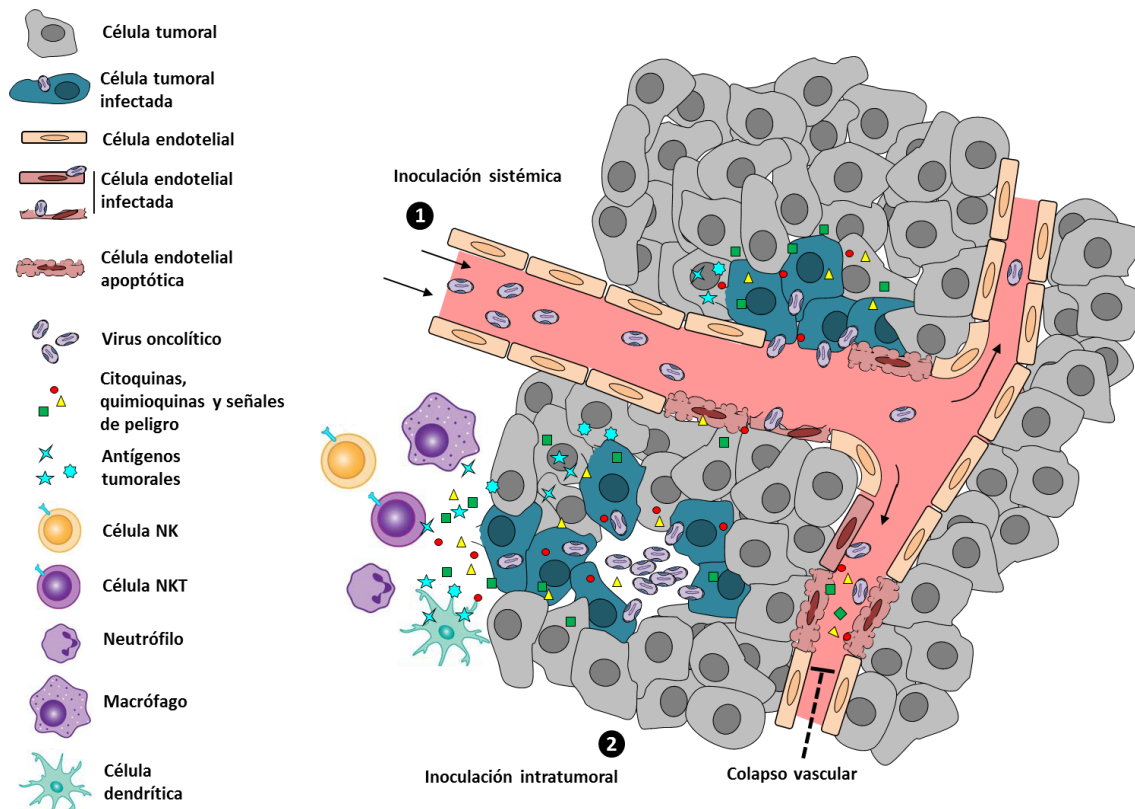


Figura 6. **Mecanismos de acción de la oncolisis viral.** El esquema representa los distintos modos de acción de la oncolisis viral: infección y lisis de las células tumorales, de las células del estroma asociado a tumor y de las células epiteliales que conforman el sistema vascular dentro del tumor (llegando a causar el colapso vascular); reclutamiento hacia el sitio de infección de células del sistema inmune de respuesta innata y adaptativa mediante la liberación de citoquinas, quimioquinas y señales de peligro; y liberación al medio extracelular de antígenos asociados a tumor. En la imagen se muestran las distintas rutas de acceso al tumor: administración del inóculo por vía sistémica (1) o por vía intratumoral (2).

En esta misma dirección, y gracias a los avances realizados en el campo de la inmunoterapia y con la intención de optimizar la respuesta inmune anti-tumoral, se ha combinado el uso de virus oncolíticos con la expresión de transgenes inmunostimuladores (GM-CSF, IL-2, IL-4, IL-12, IL-15, FLT3L, CCL3, CD40L, IFN α 1, IFN β 1, IFN γ , 4-1BBL, CD80, etc.), con la expresión de AAT (oncogén neo, antígeno carcino-embriionario, antígeno epitelial tumoral, etc.), con la transferencia de linfocitos T autólogos específicos del virus oncolítico o linfocitos T o células CIK (del inglés “*Cytokine-Induced Killer*”) infectadas con el virus oncolítico que actúan como transportadoras, o con el uso de anticuerpos frente a los puntos de control de bloqueo

que inhiben la respuesta de los TIL (anti-CTLA-4 o anti-PD-1) (Keller & Bell, 2016; Lichty *et al.*, 2014).

La oncolisis viral se presenta, por tanto, como un tratamiento alternativo a las terapias tradicionales frente al cáncer que ha mostrado resultados muy prometedores, y que continúa evolucionando e implementando las plataformas que utiliza como agentes oncolíticos, adaptándolos según los avances en el campo y la experiencia obtenida en investigación clínica. Así, actualmente, se ha conseguido aprobar el uso en Estados Unidos de América y en Europa del primer vector oncolítico para el tratamiento de melanoma: *Imlygic*TM (OncoVex), basado en el virus herpes simplex 1 (HSV-1) que presenta el transgen de GM-CSF; así mismo, hay en marcha un gran número de ensayos clínicos (en distintas fases de su desarrollo) en los que se están usando virus oncolíticos para el tratamiento de tumores empleando vectores basados en adenovirus (p. ej. LOAd703, para cáncer de páncreas), virus Measles (p. ej. MV-NIS, para múltiples cánceres), reovirus (p. ej. Reovirus salvaje, para multitud de cánceres), HSV (p. ej. HF10 -TBI-1401-, para melanoma) y virus vaccinia (p. ej. Pexa-Vec® -JX-954-, para carcinoma hepatocelular) (Keller & Bell, 2016).

1.5. La oncolisis viral y el virus vaccinia

1.5.1. Consideraciones generales

El tratamiento de tumores basado en el uso de virus oncolíticos, encuentra en el virus vaccinia (así como en otros poxvirus: virus canarypox o virus parapox) una plataforma que se ajusta a las necesidades de la estrategia, presentando además multitud de ventajas. Como una de las principales características que presenta el virus vaccinia como agente oncolítico, se encuentra el hecho de que presenta un ciclo de replicación y lisis relativamente rápido en comparación con otras especies de virus, habiéndose observado la liberación de partículas virales tras las primeras 8 horas de infección, y la completa destrucción de células infectadas entre las 48-72 hpi, lo que supone un factor determinante (Wein *et al.*, 2003). Por otro lado, el virus vaccinia presenta un amplio tropismo celular (incluyendo células tumorales); debido a que la entrada en la célula se produce por diversos mecanismos de fusión de membranas sin requerir la unión a receptores celulares específicos como es el caso de otros muchos virus (Dimitrov, 2004; McFadden, 2005a).

Otra de las características está relacionada con la producción de dos formas de partículas infectivas (VM y VE), de las cuales el virión extracelular (que presenta una membrana adicional al VM) expone menos proteínas virales en su superficie, lo que le permite dispersarse por el torrente sanguíneo mostrando cierta resistencia a ser eliminado por el sistema del complemento o por anticuerpos neutralizantes (haciendo potencialmente accesibles a los tumores metastáticos a una infección secundaria); esto resalta la versatilidad del virus vaccinia para dispersarse e infectar distintos focos tumorales, así como posibilita una administración por ruta sistémica (Kirn *et al.*, 2008).

Otro punto a destacar es la habilidad que presenta el virus vaccinia para incorporar múltiples transgenes de gran tamaño de forma estable (Smith & Moss, 1983), lo que le dota de la capacidad de combinar su potencial oncolítico con otras estrategias basadas en inmuno-terapia. Uno de los efectos asociados a la infección con el virus vaccinia es la naturaleza altamente inmunogénica que presenta, induciendo una fuerte respuesta de linfocitos T citotóxicos (Miller *et al.*, 2008) y de anticuerpos neutralizantes (Putz *et al.*, 2006), lo que unido a la infección de los tejidos de soporte tumorales que no presentan un entorno inmuno-supresivo, ayuda a la inducción de una respuesta innata y adaptativa anti-tumoral y al reclutamiento de células del sistema inmune al sitio de infección en el tumor (Kirn & Thorne, 2009).

Otro de los factores críticos, aunque más referido a la seguridad del virus que a su potencial oncolítico, es la seguridad que presenta el uso del virus vaccinia dada la ausencia de integración del ADN genómico viral en las células infectadas (al llevar a cabo su replicación íntegramente en el citoplasma celular). Igualmente, el virus vaccinia permite un proceso de producción a gran escala asequible, dado su alto rendimiento en la producción de partículas virales infectivas (Joklik & Becker, 1964).

El virus vaccinia engloba varias cepas virales replicativas, que difieren en sus propiedades y virulencia en humano o en distintos modelos animales y que se han empleado para el desarrollo de agentes oncolíticos. Entre ellas se encuentran Wyeth (también conocida como NYCBOH, del inglés “*New York City Board Of Health*”; empleada extensamente en ensayos clínicos), Copenhagen, Lister (utilizada durante la campaña de vacunación frente al virus de la viruela) y WR (del inglés “*Western Reserve*”). En el presente trabajo se hace uso de la cepa WR, que deriva de la cepa Wyeth, a través de pases sucesivos de infección en cerebro de ratones; se trata de una de

las cepas más usadas en laboratorio, caracterizada por ser virulenta en ratones y descrita como neuro-virulenta y con una elevada capacidad lítica (Law *et al.*, 2005; Parker RF, 1941).

1.5.2. Generación de virus oncolíticos basados en el virus vaccinia

De esta forma, y habiéndose descrito las propiedades oncolíticas inherentes del virus vaccinia, queda resaltar la estrategia que se emplea para que la infección quede restringida al contexto tumoral. Un hecho de suma importancia en la oncolisis viral es que la infección, y por tanto la lisis, tengan lugar únicamente en tumores. Éste fenómeno resulta obvio para aquellos virus cuya infección está mediada por receptores o factores presentes en células tumorales; sin embargo, dado el amplio tropismo de infección que presenta el virus vaccinia y los mecanismos de entrada en la célula, la estrategia de la especificidad por células tumorales queda invalidada, por lo que se hace necesario el diseño de una estrategia para conseguir dicho objetivo.

Así, la mejor aproximación consistiría en modificar el virus de forma que se favorezca su replicación en un contexto tumoral y que, a su vez, se dificulte una infección exitosa en tejidos sanos. Para desarrollar esta estrategia, adquieren un papel fundamental las “marcas distintivas del cáncer”, de forma que las modificaciones que se realizan sobre el virus oncolítico van dirigidas a elementos no esenciales del virus que desempeñan un papel importante en la infección de células en un contexto somático, pero que pueden verse como redundantes o carentes de utilidad en un contexto tumoral dadas las características particulares del mismo. Existen varios grupos de genes que responden a este perfil: 1) Genes implicados en el metabolismo de nucleótidos (*A48R*, *A57R*, *F2L*, *F4L*, *I4L* y *J2R*); 2) Genes involucrados en el bloqueo de la respuesta anti-viral celular de IFN (*B8R*, *B18R*, *E3L* y *K3L*); 3) Gen implicado en la inducción de la división celular (*CI1R*); 4) Genes involucrados en el bloqueo de la inducción de apoptosis (*B22R*, *B13R* o *FIL*); y 5) Genes que modulan el perfil metabólico celular (*CI6L*) (Andrew A. Mercer, 2007).

De esta forma, en un contexto tumoral los virus a los que se les haya delecionado alguno de estos genes (o su combinación) infectarán y replicarán normalmente, ya que el microambiente tumoral (**Figura 7**): puede proveer de la demanda de nucleótidos necesarios para la replicación viral (virus mutantes de delección de genes involucrados en el metabolismo de nucleótidos); presenta alterada la respuesta a IFN (virus mutantes

de delección de genes involucrados en el bloqueo de la respuesta IFN); presenta bloqueo en la apoptosis (virus mutantes de delección de genes involucrados en el bloqueo de la apoptosis); presentan una señalización sostenida de proliferación tumoral (virus mutantes de delección del factor mitogénico); presenta alterada la regulación del metabolismo celular -glucólisis y ciclo del ácido cítrico- (virus mutantes de delección de genes involucrados en la inducción de hipoxia); y presenta un contexto inmunosupresivo que previene la eliminación de la infección en tiempos tempranos.

Sin embargo, en un contexto somático en el que se infecten tejidos sanos (**Figura 7**), los virus mutantes de delección presentarán mayores dificultades en el desarrollo de una infección exitosa, ya que el sistema inmune eliminará más rápidamente la infección mediante señales celulares de peligro y la respuesta inmune innata y adaptativa dada la delección de los componentes virales no esenciales, pero necesarios.

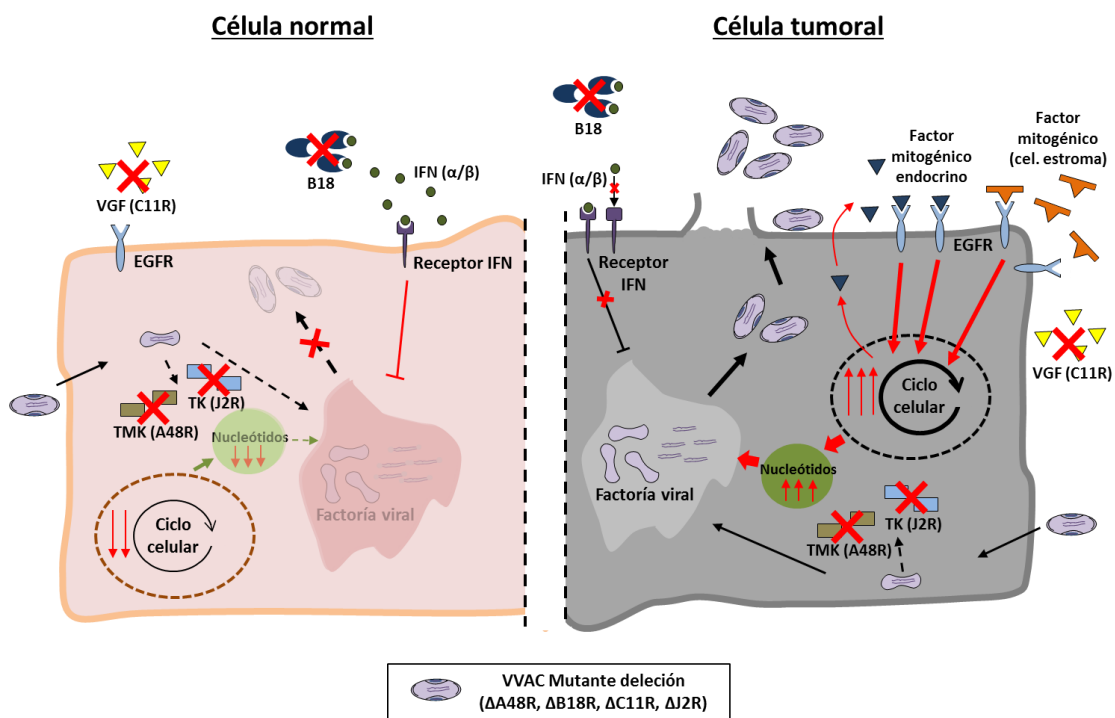


Figura 7. **Mecanismo de restricción tumoral en el VVAC.** En el esquema se muestra un ejemplo del efecto de delecciones en genes no esenciales en el VVAC sobre la replicación del virus en un tejido sano (la carencia de mecanismos frente a la respuesta celular anti-viral -*B18R*-, o la cantidad insuficiente de nucleótidos producidos de forma autónoma -*A48R*, *J2R*- o mediante la inducción de la proliferación celular -*C11R*-); o en un tejido tumoral en el cual las carencias de componentes virales para llevar a cabo una

replicación exitosa las aportan las mismas células tumorales (marcas distintivas del cáncer).

Así, el uso del virus vaccinia en oncolisis viral responde a los principales mecanismos de acción vistos en otros virus oncolíticos; produciéndose la lisis directa de las células tumorales infectadas (liberando AAT y neo-antígenos tumorales), la muerte celular mediada por células del sistema inmune (ya que la lisis de células infectadas libera al medio señales de daño celular -DAMP- y señales de daño viral -PAMP- (Rubartelli & Lotze, 2007; Zhu *et al.*, 2007)), y causando el colapso vascular del tumor (Kirn & Thorne, 2009). De la misma forma que ocurre con otros vectores virales oncolíticos, el virus vaccinia se puede optimizar mediante la inserción de transgenes inmunoestimuladores o AAT, o utilizándolos conjuntamente con inmuno-terapia.

1.5.3. Genes candidatos para deleccionar

En el presente trabajo, se ha establecido como estrategia para conseguir la “restricción” de la replicación viral al contexto tumoral, combinaciones de delecciones de los siguientes genes virales de la cepa WR del virus vaccinia: *A48R*, *B18R*, *C11R*, *C16L*, *F1L* y *J2R*.

-*J2R*: Gen implicado en el metabolismo de nucleótidos que codifica la enzima timidina quinasa de 20 kDa, cuya actividad es catalizar la fosforilación de la timidina para obtener timidina 5'-monofosfato (dTMP). Se ha descrito que la delección de este gen produce una disminución en la virulencia del virus vaccinia (Buller *et al.*, 1985).

-*A48R*: Gen involucrado en el metabolismo de nucleótidos que codifica la enzima timidilato quinasa de 23 kDa, cuya actividad es catalizar la fosforilación de la timidina 5'-monofosfato (dTMP) para producir timidina 5'-difosfato (dTDP), que será convertida posteriormente por la enzima nucleósido-difosfato quinasa en timidina 5'-trifosfato (dTTP) (Cui *et al.*, 2013). Se ha descrito que la delección de este gen atenúa al virus WR en el mismo grado que la delección del virus J2R y que la delección de ambos genes aumenta dicha atenuación (Hughes *et al.*, 1991).

-*B18R*: Gen implicado en el bloqueo de la respuesta anti-viral mediada por IFN, que codifica una glicoproteína que actúa como receptor soluble de las moléculas de IFN tipo I de 40 kDa (cuando se expresa *in vitro*) o 60-65 kDa cuando se secreta de células infectadas, está relacionada con los receptores de IL-1 y es miembro de la super-familia

de inmunoglobulinas; presenta además una especificidad de reconocimiento intra-especie muy amplia y su delección se ha relacionado con atenuación en el modelo de ratón (Symons *et al.*, 1995).

-*C11R*: Gen localizado en los extremos repetidos del genoma del virus vaccinia (dos copias del gen), involucrado en la estimulación de la proliferación celular que codifica el factor de crecimiento de vaccinia (VGF, del inglés “*Vaccinia Growth Factor*”), un factor mitogénico secretable de 15 kDa, homólogo al factor de crecimiento epitelial celular (EGF) y que se une al receptor EGFR estimulando así la proliferación de la célula infectada así como la de las células adyacentes (de Magalhaes *et al.*, 2001).

-*C16L*: Gen situado en los extremos repetidos del genoma del virus vaccinia (dos copias del gen), que codifica un factor de virulencia 37,5 kDa involucrado en la reprogramación del metabolismo energético celular. Su mecanismo de acción está mediado por su unión a la proteína que contiene el dominio de la prolil-hidroxilasa (PHD2) -un sensor de oxígeno-, de forma que previene la degradación del factor de transcripción inducible por hipoxia HIF-1 α , cuya translocación al núcleo va a dar lugar a la transcripción de genes involucrados en el aumento de absorción de oxígeno (induciendo angiogénesis y eritropoyesis) y en la disminución del consumo de oxígeno (produciendo un cambio metabólico de la fosforilación oxidativa hacia la glicolisis) en condiciones de normoxia (Mazzon *et al.*, 2015; Mazzon *et al.*, 2013). Además, se ha observado que la proteína C16 está involucrada en la absorción de glutamina que participa en el mantenimiento de la actividad del ciclo del ácido cítrico en la infección por el virus vaccinia (Greseth & Traktman, 2014; Mazzon *et al.*, 2015). Adicionalmente, se ha descrito la asociación entre C16 y la inhibición de la respuesta inmune innata frente al ADN viral, basada en la inhibición de los receptores de reconocimiento de patrones para el ADN mediante la unión de la región C terminal de C16 con la proteína Ku del complejo de la proteína-quinasa-dependiente-de-ADN (Peters *et al.*, 2013). Se ha descrito que su delección disminuye la virulencia del virus vaccinia en el modelo de ratón (Fahy *et al.*, 2008).

-*FIL*: Gen involucrado en el bloqueo de la apoptosis que codifica una proteína de 26 kDa homóloga de Bcl-2 (del inglés “*B-cell CLL/lymphoma 2*”) y que bloquea la apoptosis a nivel mitocondrial actuando como inhibidor de la caspasa 9 y del punto de

control Bak/Bax. Se ha descrito que su delección disminuye la virulencia del virus vaccinia en el modelo de ratón (Gerlic *et al.*, 2013; Wasilenko *et al.*, 2003).

2. Objetivos

El cáncer constituye actualmente uno de los principales problemas de salud pública y como tal, además de los tratamientos “convencionales” basados principalmente en quimioterapia, radioterapia y cirugía, se están llevando a cabo enormes progresos en la mejora de las terapias actuales y en el desarrollo de nuevos métodos de prognosis y nuevas terapias.

Atendiendo al papel clave que el virus vaccinia ha venido demostrando como vector vacunal, los poxvirus se están empleado como vacunas frente a tumores aprovechando su capacidad para inducir respuesta inmune específica frente a antígenos asociados a tumor y como agentes oncolíticos en terapias frente a estos mismos tumores.

En esta tesis y siguiendo esta dirección, se han diseñado y generado una serie de virus recombinantes y/o mutantes de delección basados en el virus vaccinia para su evaluación como agentes terapéuticos en su vertiente oncolítica. Para ello, se han propuesto los siguientes objetivos:

- 1) Diseño y generación de vectores virales candidatos.
- 2) Caracterización *in vitro* de las principales características de los virus mutantes.
- 3) Caracterización *in vivo* de la seguridad y comportamiento de los vectores oncolíticos.
- 4) Evaluación de la eficacia *in vivo* de los virus candidatos en modelo singénico de trasplante de células tumorales.
- 5) Selección del mejor candidato y análisis de sus propiedades *in vivo*.

3. Materiales y Métodos

3.1. Materiales

3.1.1. Líneas celulares

En el presente trabajo se han utilizado las siguientes líneas celulares:

-BSC40: Células epiteliales derivadas de riñón de mono verde africano *Cercopithecus aethiops*.

-B16F10: Células derivadas de melanoma murino de ratón C57BL/6J.

-CEF: Cultivos primarios de fibroblastos embrionarios de pollo (*Gallus gallus*) obtenidos a partir de embriones de 11 días de incubación.

-HeLa: Células epiteliales humanas derivadas de un adenocarcinoma de cérvix.

-TRAMP-C1: Células epiteliales derivadas de un adenocarcinoma de próstata de ratón C57BL/6TgN(TRAMP)8247Ng.

3.1.2. Medios de cultivo

Las líneas celulares BSC40, CEF y HeLa se cultivaron en medio esencial mínimo de Eagle modificado por Dulbecco (DMEM) (Gibco) complementado con aminoácidos no esenciales (Sigma, 1X), L-glutamina (Merck, 2 mM), penicilina (Sigma, 100 U/ml), estreptomicina (Sigma, 100 µg/ml), fungizona (Gibco, 0,5 µg/ml) y gentamicina (Sigma, 0,05 mg/ml). Para la línea celular B16F10 se hizo uso del mismo DMEM complementado pero a una concentración de L-glutamina de 4 mM. Todas las líneas celulares se mantuvieron en cultivo en presencia de suero al 10% (v/v): Suero fetal de ternera (FCS, Gibco) para la línea celular CEF y suero de ternera recién nacida (NCS, Gibco) para las líneas celulares BSC40, B16F10 y HeLa.

En el caso de los cultivos primarios de linfocitos de ratón se utilizó el medio Roswell Park Memorial Institute RPMI-1640 (Gibco), complementado con HEPES pH 7,4 (10

mM), penicilina/estreptomicina (Sigma, 100 U/ml), β -mercaptoetanol (10 μ M) y 10% (v/v) FCS.

Para la línea celular TRAMP-C1 se empleó DMEM (ajustado con glucosa (4,5 g/l) y bicarbonato sódico (1,5 g/l)) complementado con L-glutamina (4 mM), insulina bovina (GEMINI BIO-PRODUCTS, 0,005 mg/ml), dehidroisoandrosterona (Sigma-Aldrich, 10 nM), aminoácidos no esenciales (Sigma, 1X), y en presencia de 5% (v/v) FCS (Gibco) y 5% (v/v) Nu-Serum IV (BD Bioscience).

El medio OPTIMEM[®] (Gibco) se empleó como medio de cultivo transitorio durante las transfecciones de las líneas celulares.

En aquellos experimentos que requerían la infección de cualquiera de las líneas celulares, se utilizaron los distintos medios de cultivo correspondientes en ausencia de suero durante la adsorción del inóculo viral y en presencia de 2% (v/v) de suero durante el tiempo de infección posterior.

Para el aislamiento de las placas de los distintos virus recombinantes durante su generación, se empleó medio sólido (ratio en volumen 1:1 de DMEM 2X y agarosa 1,9% -p/v-) en presencia de suero al 2% (v/v).

Todas las líneas celulares se mantuvieron en una incubadora a una temperatura de 37°C, con un porcentaje de CO₂ del 5% y con una humedad del 85%.

3.1.3. Bacterias

En el presente trabajo se han utilizado las cepas DH5 α y DH10B de *Escherichia coli* para las transformaciones bacterianas, obtención de clones durante la generación de plásmidos y producción de dichos plásmidos. En todos los casos, las bacterias se cultivaron en medio LB (Luria-Bertani) (1% bacto-triptona, 1% NaCl y 0,5% extracto de levadura, pH 7)(Green & Sambrook, 2012) en presencia de ampicilina (Boehringer Mannheim, 100 μ g/ml).

3.1.4. Virus

Los virus recombinantes y/o mutantes de delección generados para este trabajo están basados en el virus vaccinia parental de la cepa salvaje WR (Western Reserve) cedida por el Dr. Rostom Bablanian de la Universidad Estatal de Nueva York. Los virus generados y empleados aparecen detallados en la **Tabla 1**.

Virus	Antígeno/s insertado/s	Gen/es delecionado/s
WR wt (salvaje)	----	----
WR-Luc	Luciferasa (<i>Photinus Pyralis</i>) ^a	<i>J2R</i>
WR-ΔA48R-ΔB18R-ΔC11R (WR-Δ3)	----	<i>A48R</i> , <i>B18R</i> y <i>C11R</i>
WR-Δ3-Luc	Luciferasa (<i>Photinus Pyralis</i>) ^b	<i>A48R</i> , <i>B18R</i> , <i>C11R</i> y <i>J2R</i>
WR-Δ3-GFP	GFP (<i>Aequorea victoria</i>) ^b	<i>A48R</i> , <i>B18R</i> , <i>C11R</i> y <i>J2R</i>
WR-Δ3-ΔF1L	----	<i>A48R</i> , <i>B18R</i> , <i>C11R</i> y <i>F1L</i>
WR-Δ3-ΔC16L	----	<i>A48R</i> , <i>B18R</i> , <i>C11R</i> y <i>C16L</i>

Tabla 1. Virus Vaccinia empleados. Los diferentes antígenos expresados por los virus recombinantes se encuentran bajo el control de los promotores: ^a Promotor viral temprano/tardío 7.5 ($p_{7.5}$)(Cochran *et al.*, 1985); ^b Promotor viral tardío/temprano optimizado LEO160 (p_{LEO160})(Di Pilato *et al.*, 2015b). Aquellos virus recombinantes a los que se les ha insertado algún transgen, se ha hecho en el lugar del gen *J2R* (locus TK) dando como resultado además de la inserción, la delección del gen de vaccinia *J2R*.

3.1.5. Plásmidos

Los plásmidos utilizados en el presente trabajo han sido:

pLZAW1-Luc: Vector de transferencia empleado para introducir el gen de la Luciferasa (*Photinus Pyralis*) en el lugar del gen viral *J2R* (locus TK) del virus Vaccinia mediante recombinación homóloga. Este plásmido contiene dos flancos izquierdos y uno derecho del gen *J2R* para introducir la secuencia del gen heterólogo y posteriormente poder eliminar el gen marcador empleado para el aislamiento del virus recombinante. El plásmido posee el promotor viral tardío/temprano optimizado LEO160 (p_{LEO160}), el gen reportero LacZ (β -galactosidasa), y el gen de resistencia a ampicilina (β -Lactamasa). Este plásmido fue generado por el Dr. Mauro Di Pilato.

pLZAW1-GFP: Vector de transferencia empleado para introducir el gen de la proteína verde fluorescente (GFP) (*Aequorea victoria*) en el lugar del gen viral *J2R* (locus TK) del virus Vaccinia mediante recombinación homóloga, de forma que presenta dos flancos izquierdos y uno derecho del gen *J2R* para introducir la secuencia del gen heterólogo y posteriormente poder eliminar el gen marcador empleado para el aislamiento del virus recombinante. El plásmido posee el promotor viral tardío/temprano optimizado LEO160 (p_{LEO160}), el gen reportero LacZ (β -galactosidasa), y el gen de resistencia a ampicilina (β -Lactamasa). Este plásmido fue generado por el Dr. Mauro Di Pilato.

pGEM-RG- Δ A48Rwm: Vector empleado para delecionar el gen *A48R* del virus vaccinia en la cepa WR mediante recombinación homóloga, de forma que contiene dos flancos izquierdos y un flanco derecho del gen *A48R* del genoma de WR para permitir su delección y la de los genes reporteros empleados para su seguimiento. El plásmido presenta el gen de resistencia a ampicilina (β -Lactamasa) y 2 genes reporteros bajo el control del promotor p_{eL} : 1) proteína verde fluorescente (GFP, *Aequorea victoria*), y 2) proteína roja fluorescente de *Discosoma* (DsRed2). Los oligonucleótidos que se emplearon para la generación de este plásmido se encuentran detallados en la **Tabla 4**.

Los plásmidos empleados para delecionar los genes *B18R*, *C11R*, *C16L* y *F1L*, se basan en la misma estrategia descrita para el plásmido pGEM-RG- Δ A48Rwm, y constan de los mismos componentes a excepción de las secuencias de los flancos, que son específicas para cada gen. Así, los plásmidos que se generaron y emplearon fueron: **pGEM-RG- Δ B18Rwm**, **pGEM-RG- Δ C11Rwm**, **pGEM-RG- Δ C16Lwm** y **pGEM-RG- Δ F1Lwm**. Los oligonucleótidos que se emplearon para la generación de estos plásmidos se encuentran detallados en la **Tabla 4**.

3.2. Reactivos

3.2.1. Anticuerpos

En la siguiente tabla se resumen los anticuerpos utilizados en el presente trabajo:

Anticuerpo	Características	Procedencia
ANTICUERPOS PRIMARIOS		
Conejo α WR	Anticuerpo policlonal generado en conejo frente a las proteínas de la cepa WR del virus Vaccinia.	Generados en el Centro Nacional de Biotecnología
Rata α IFNγ de ratón	Anticuerpo monoclonal de isotipo IgG1 que reconoce el IFN γ murino; clon R4-6A2.	BD Pharmingen
Conejo α PARP de humano, ratón, rata y mono	Anticuerpo policlonal generado en conejo frente a un péptido sintético que corresponde al sitio de rotura de caspasa en PARP.	Cell Signaling Technology
Conejo α β-actina de humano, ratón, rata, mono, cerdo	Anticuerpo monoclonal de isotipo IgG generado frente a un péptido sintético de β -actina humana; clon 13E5.	Cell Signaling Technology
ANTICUERPOS CONJUGADOS (ELISpot)		
Rata α IFNγ de ratón- Biotina	Anticuerpo monoclonal de isotipo IgG1 que reconoce el IFN γ murino conjugado con biotina; clon XMG1.2.	BD Pharmingen
Estreptavidina – HRP (SAv-HRP)	Peroxidasa conjugada con estreptavidina que se une a anticuerpos primarios biotinilados.	BD Pharmingen

ANTICUERPOS SECUNDARIOS CONJUGADOS (Western blot)		
Cabra α IgG de conejo - HRP	Anticuerpo policlonal generado en cabra conjugado con peroxidasa que reconoce IgG de conejo.	Sigma
ANTICUERPOS CONJUGADOS (FACS)		
Rata α F4/80 de ratón - APC	Anticuerpo monoclonal generado en rata frente al antígeno F4/80 de ratón conjugado con alofocianina; clon BM8.	eBioscience
Hámster α CD11c de ratón - FITC	Anticuerpo monoclonal generado en hámster frente al antígeno CD11c de ratón conjugado con isotiocianato de fluoresceína; clon HL3.	BD Pharmingen
Rata α CD11b de ratón – PE-Cy7	Anticuerpo monoclonal generado en rata frente al antígeno CD11b (subunidad α de Mac-1) de ratón conjugado con ficoeritrina-cianina 7; clon M1/70.	BioLegend
Rata α I-A/I-E de ratón - Biotina	Anticuerpo monoclonal generado en rata frente a los antígenos I-Ad e I-Ed de MHC tipo II de ratón conjugado con biotina; clon 2G9.	BD Pharmingen
Rata α CD45 de ratón – Brilliant Violet 570	Anticuerpo monoclonal generado en rata frente al antígeno CD45 de ratón	BioLegend

	conjugado con Violeta brillante 570; clon 30-F11.	
Rata α Ly6G de ratón - PE	Anticuerpo monoclonal generado en rata frente al antígeno Ly6G de ratón conjugado con ficoeritrina; clon 1A8.	BD Pharmingen
Hámster α CD279 de ratón - APC - eFluor 780	Anticuerpo monoclonal generado en hamster frente al antígeno CD279 (PD-1) de ratón conjugado con alofocianina eFluor 780; clon J43.	eBioscience
Hámster α CD69 de ratón - FITC	Anticuerpo monoclonal generado en hámster frente al antígeno CD69 de ratón conjugado con isotiocianato de fluoresceína; clon H1.2F3.	BD Pharmingen
Rata α CD19 de ratón – APC-Cy7	Anticuerpo monoclonal generado en rata frente al antígeno CD19 de ratón conjugado con alofocianina Cy7; clon 1D3.	BD Pharmingen
Rata α CD335 de ratón - APC	Anticuerpo monoclonal generado en rata frente al antígeno CD335 (NKP46) de ratón conjugado con alofocianina; clon 29A1.4.	BioLegend
Rata α CD16/CD32 de ratón (no conjugado)	Anticuerpo monoclonal generado en rata que se une	BD Pharmingen

	específicamente a los receptores FC γ III y FC γ II de ratón, bloqueando uniones inespecíficas por parte de las inmunoglobulinas; clon 2.4G2.	
Rata α CD3a de ratón- APC - eFluor 780	Anticuerpo monoclonal generado en rata frente al antígeno CD3 de ratón conjugado con aloficocianina eFluor 780; clon 17A2.	eBioscience
Rata α CD3a de ratón- Biotina	Anticuerpo monoclonal generado en rata frente al antígeno CD3 de ratón conjugado con biotina; clon 17A2.	eBioscience
Rata α CD4-PE	Anticuerpo monoclonal generado en rata frente al antígeno CD4 de ratón conjugado con ficoeritrina; clon GK1.5.	Beckman Coulter
Rata α CD8a- PE-Cy7	Anticuerpo monoclonal generado en rata frente al antígeno CD8a de ratón conjugado con ficoeritrina-cianina 7; clon 53-6.7.	BioLegend
Estreptavidina – eFluor 450	Fluorocromo eFluor 450 conjugado con estreptavidina que se une a anticuerpos primarios biotinilados.	eBioscience

Tabla 2. Anticuerpos utilizados.

3.2.2. Péptidos

Para la determinación de la respuesta inmune específica generada en ratón frente al virus vaccinia se empleó el péptido de B8R (Tscharke *et al.*, 2005), y para los antígenos de melanoma se emplearon los péptidos de gp100 y TRP-2, todos ellos son péptidos CD8 específicos (**Tabla 3**). El péptido de B8R fue sintetizado por el servicio de proteómica del Centro Nacional de Biotecnología. Los péptidos de antígenos de melanoma han sido cedidos amablemente por el doctor David Sancho y se adquirieron en AnaSpec: gp100 (AS-62589), y TRP-2 (AS-61058).

Péptido	Haplotipo MHC	Secuencia
B8R ₂₀₋₂₇	H-2K ^b	TSYKFESV
gp100 ₂₅₋₃₃	H-2D ^b	KVPRNQDWL
TRP-2 ₁₈₀₋₁₈₈	H-2D ^b	SVYDFVWL

Tabla 3. Péptidos utilizados.

3.2.3. Oligonucleótidos

Los oligonucleótidos que se han utilizado en el presente trabajo se detallan en la siguiente tabla:

Oligonucleótido	Secuencia (5' – 3')	Molde
TK1	AACGGCGGACATATTCAG	TK: WR/MVA
TK2	ATGAGTCGATGTAACACT	TK: WR/MVA
Myc A	GGCGAATGGGTGAGTAACACG	<i>Mycoplasma</i>
Myc B	CGGATAACGCTTGCGACCTATG	<i>Mycoplasma</i>
A48R LF-F (<i>Apa</i> I)	GTCATTGGGCCCTCGATCATGAATGG	Flanco izquierdo A48R WR
A48R LF-R (<i>SpH</i> I)	TACAATGCATGCGTATAATAAACTG	Flanco izquierdo A48R WR
A48R LFPri-F (<i>Eco</i> RI)	GTCATTGAATTCTCGATCATGAATGG	Flanco izquierdo A48R WR

A48R LFpri-R (<i>Cla</i> I)	TACAAT <u>ATCGAT</u> GTATAATAAACTG	Flanco izquierdo A48R WR
A48R RF-F (<i>Cla</i> I)	GGGGC <u>ATCGAT</u> GGATGTAATAGTG	Flanco derecho A48R WR
A48R RF-R (<i>Bam</i> H I)	CTATACAGGATCCAATTTTCATTGTCG	Flanco derecho A48R WR
A48R interno-F	GTCTCGTGGGGCATTAAATCG	A48R WR
A48R interno-R	CCAGTAACCGTGTGTATAGC	A48R WR
B18R LF-F (<i>Apa</i> I)	C <u>GGGCC</u> CATTTTCAAATAACATGTCG	Flanco izquierdo B18R WR
B18R LF-R (<i>SpH</i> I)	ACAT <u>G</u> CATGCTTTACACACATCGCATG AG	Flanco izquierdo B18R WR
B18R LFpri-F (<i>Eco</i> RI)	<u>GGAATTC</u> ATTTTCAAATAACATGTCG	Flanco izquierdo B18R WR
B18R LFpri-R (<i>Cla</i> I)	CC <u>ATCGAT</u> TTTACACACATCGCATGAG	Flanco izquierdo B18R WR
B18R RF-F (<i>Cla</i> I)	CCATCGATATACAATGCATTTTTATAT AC	Flanco derecho B18R WR
B18R RF-R (<i>Bam</i> H I)	C <u>GGGATCCT</u> ACTAGTTGTGTACTTTGA TC	Flanco derecho B18R WR
B18R interno-F	CCACAGTTACGCCATAGACATCG	B18R WR
B18R interno-R	CCACGACATTTATATGTATTACC	B18R WR
C11R LF-F (<i>Apa</i> I)	C <u>GGGCCCT</u> CGTTTATTCAGATCGCAGT G	Flanco izquierdo C11R WR
C11R LF-R (<i>SpH</i> I)	ACAT <u>G</u> CATGCATAAACTAATAATATAT TG	Flanco izquierdo C11R WR
C11R LFpri-F (<i>Eco</i> RI)	<u>GGAATTC</u> TCTCGTTTATTCAGATCGCAGT G	Flanco izquierdo C11R WR
C11R LFpri-R (<i>Cla</i> I)	CC <u>ATCGAT</u> ATAAACTAATAATATATTG	Flanco izquierdo C11R WR
C11R RF-F (<i>Cla</i> I)	CC <u>ATCGAT</u> TTTTTATAAATTTTTTATG AG	Flanco derecho C11R WR
C11R RF-R (<i>Bam</i> H I)	C <u>GGGATCCA</u> ACAGGAATATAGCATGG	Flanco derecho

	GAC	<i>C11R</i> WR
C11R interno-F	GATGTTGTTGTTTCGCTGCTATG	<i>C11R</i> WR
C11R interno-R	GCACAACCATATCTTGTATAGG	<i>C11R</i> WR
C16L LF-F (<i>Apa</i> I)	GGTATGTACCAGGGCCCGTCGCGAAC GATGCGTACAATCTCG	Flanco izquierdo <i>C16L</i> WR
C16L LF-R (<i>SpH</i> I)	CGAAATAAAAAGCATGCGTATAATAT CTAGAGGTAGAGG	Flanco izquierdo <i>C16L</i> WR
C16L LFpri-F (<i>EcoRI</i>)	GGTATGTACCAGAATTCGTCGCGAACG ATGCGTACAATCTCG	Flanco izquierdo <i>C16L</i> WR
C16L LFpri-R (<i>Sma</i> I)	CGAAATAAAAACCCGGGGTATAATAT CTAGAGGTAGAGG	Flanco izquierdo <i>C16L</i> WR
C16L RF-F (<i>Cla</i> I)	GCTTTATTATATTATCGATGAATGATT GTTTGACGAATCACG	Flanco derecho <i>C16L</i> WR
C16L RF-R (<i>Bam</i> H I)	CCTAAATTATGGATCCGGAGATCATA TACCACAAC	Flanco derecho <i>C16L</i> WR
C16L interno-F	ATGGATATTTACGACGATAAAGG	<i>C16L</i> WR
C16L interno-R	TTATTTTCGGCATATTAAGTAAAATC	<i>C16L</i> WR
F1L LF-F (<i>Apa</i> I)	TTACCAGGGCCCGAAGACTGTAC	Flanco izquierdo <i>F1L</i> WR
F1L LF-R (<i>SpH</i> I)	ATGATAGCATGCTTTTTTTTAAAC	Flanco izquierdo <i>F1L</i> WR
F1L LFpri-F (<i>EcoRI</i>)	TTACCAGAATTCGAAGACTGTAC	Flanco izquierdo <i>F1L</i> WR
F1L LFpri-R (<i>Cla</i> I)	CATCGAATCGATACTATTGTTTAT	Flanco izquierdo <i>F1L</i> WR
F1L RF-F (<i>Cla</i> I)	GATAATCGATTTTTTTTTTAAACACG	Flanco derecho <i>F1L</i> WR
F1L RF-R (<i>Bam</i> H I)	TTATAGGATCCCTCCAGGAGAAAG	Flanco derecho <i>F1L</i> WR
F1L interno-F	ATGTTGTCGATGTTTATGTGTAATAAT ATC	<i>F1L</i> WR
F1L interno-R	TTATCCTATCATGTATTTGAGAGTTTTA TATG	<i>F1L</i> WR

Tabla 4. Oligonucleótidos utilizados. Las dianas de restricción aparecen subrayadas.

3.2.4. Tampones

Durante el presente trabajo se han utilizado las siguientes soluciones tamponadas:

Laemmli (1X): Azul de bromofenol 0.1%, glicerol 10%, SDS 2%, Tris-HCl 50 mM pH 6.8 y 2-Mercaptoetanol 5%.

PBS: NaCl 137 mM, KCl 2.7 mM, Na₂PO₄ 8 mM y KH₂PO₄ 1.5 mM.

PBS Staining: PBS 1x, 0,5% BSA, 1% FCS, 0,065% Azida sódica y 2 mM EDTA.

Tampón carbonato (0.1 M pH 9.6): Na₂CO₃ 0.2 M y NaHCO₃ 0.2 M.

Tampón de carga (Laemmli): Tris-HCl 50 mM pH 6.8, SDS 2%, β-mercaptoetanol 5%, glicerol 10% y azul de bromofenol 0.012%.

Tampón de carga de ADN: Xylen-cyanol 0.25%, glicerol 30% y azul de bromofenol 0.25%.

Tampón de electroforesis para SDS-PAGE (Tris-glicina SDS): Tris 25 mM, glicina 192 mM y SDS 0.1%.

Tampón de Proteinasa K: Tris-HCl 50 mM pH 8.0, EDTA 100 mM, NaCl 100 mM y SDS 1%.

Tampón de transferencia: Tris 25 mM, glicina 192 mM y metanol 20%, pH 8.3.

TBE: Tris-Borato pH 8.3 90 mM y EDTA 2 mM.

TBS: 0.5M Tris Base, 9% NaCl, pH 8.4.

3.3. Metodología

3.3.1. Técnicas de manipulación del ADN

Las técnicas empleadas para la preparación y transformación de bacterias competentes, la purificación de fragmentos de ADN, y la generación y purificación de plásmidos se

han llevado a cabo según la metodología descrita en el libro “Molecular Cloning: a laboratory manual” (Green & Sambrook, 2012).

3.3.1.1. Purificación de ácidos nucleicos

-Purificación de fragmentos de ADN

La purificación de fragmentos de ADN procedentes de reacciones de PCR o de extracción de geles de agarosa se llevó a cabo con los kits “MinElute PCR Purification kit” y “QIAquick Gel Extraction kit” (QIAGEN).

-Purificación de ARN

La purificación de ARN de los cultivos celulares se llevó a cabo usando el kit “RNeasy Mini kit” (QIAGEN) siguiendo las recomendaciones del fabricante.

-Purificación de ADN plasmídico

Para la comprobación de las colonias bacterianas positivas durante el proceso de clonación y generación de nuevos plásmidos, se emplearon cultivos de 3 ml de medio LB y se siguió el protocolo de lisis alcalina previamente descrito (Green & Sambrook, 2012).

Para la producción de cantidades mayores de ADN plasmídico para transfecciones y generación de nuevos plásmidos se utilizó el kit “Plasmid Maxi kit” (QIAGEN) siguiendo el protocolo proporcionado por el fabricante.

-Purificación de ADN genómico de células en cultivo infectadas

Cuando se observó efecto citopático, la monocapa de células se recogió y se centrifugó (2000 rpm – 2 min) y el precipitado se conservó a -20 °C hasta su utilización. Para la extracción del ADN, se resuspendieron las células en Tris-HCl 50 mM pH 8.0, y se añadió Proteinasa K (200 µg/ml, Roche) en su tampón correspondiente (50 mM Tris-HCl pH 8.0, 100 mM EDTA pH 8.0, 100 mM NaCl, 1% SDS). Se incubó a 55 °C durante 1-2 horas, tras lo cual se añadió RNAsa A (40 µg/ml, PanReac AppliChem) y se incubó a 37 °C durante 30 min. Una vez finalizada la incubación, se añadió NaCl saturado y se mezcló cuidadosamente. A continuación, se centrifugó a 10000 rpm durante 10 min. a 4 °C. Se recogió el sobrenadante y se mezcló con isopropanol (proporción 1:0,7 –v/v-). La mezcla se centrifugó a 10000 rpm durante 10 min. a

temperatura ambiente, el precipitado se lavó con etanol al 75% (v/v) y de nuevo se centrifugó 10 min a temperatura ambiente. Finalmente, el ADN precipitado se dejó secar a temperatura ambiente y se resuspendió en 30 µl de H₂O destilada estéril. La concentración de ADN se midió utilizando un NanoDrop (Thermo Scientific, Wilmington, USA).

El ADN obtenido se ha empleado para comprobar mediante PCR las correctas inserciones o deleciones en los genomas de los virus a generar.

3.3.1.2. Análisis por PCR

El ensayo de la reacción en cadena de la polimerasa se empleó para la amplificación de fragmentos de ADN para la generación de nuevos plásmidos mediante clonación (empleando en este caso la ADN polimerasa Platinum *Pfx* - Invitrogen) y para la comprobación de la inserción de los genes heterólogos o la deleción de genes virales durante la generación de los virus recombinantes y/o mutantes de deleción (empleando para esto, la ADN polimerasa recombinante *Taq* - Invitrogen). En todos los casos, se utilizaron 200 ng de ADN molde, oligonucleótidos (0,4 µM), 1-2,5 unidades de polimerasa, el tampón correspondiente a cada enzima, 0,2 mM de cada uno de los desoxinucleótidos trifosfato, y 1,5 mM de MgSO₄ o MgCl₂ (según la ADN polimerasa utilizada). Se empleó una temperatura de anillamiento y un tiempo de extensión diferentes en función de la temperatura de fusión de los oligonucleótidos y de la longitud del fragmento a amplificar. Las diferentes reacciones de amplificación se llevaron a cabo empleando un termociclador VeritiTM 96-well (Applied Biosystems).

3.3.1.3. Reacción de transcripción inversa en cadena de la polimerasa (RT-PCR)

El protocolo se llevó a cabo partiendo de las muestras de ARN purificado procedente de monocapas de células infectadas. Inicialmente, las muestras de ARN fueron tratadas con DNasa I recombinante (DNase I recombinant, RNase-Free, ROCHE) a una concentración de 1 unidad de DNasa/1 µg ARN total, durante 30 min. a 25°C. Transcurrido el tiempo de incubación, se paró la reacción incubando las muestras 5 min. a 75°C y se volvieron a limpiar empleando el kit "RNeasy Mini kit" (QIAGEN).

Para llevar a cabo la reacción de transcripción inversa, se incubó 1 µg de ARN total (tratado con DNasa) con 500 ng de oligonucleótido dT₁₂₋₁₈ (Invitrogen) y 1 µl de

desoxinucleótidos trifosfato (a una concentración de 10 mM de cada uno de ellos) a 65°C durante 5 min. Tras el período de incubación, se añadió a la mezcla: DTT (5 µM), 40 unidades de inhibidor de RNasas (“RNasin Ribonuclease inhibitor”, Promega), 200 unidades de transcriptasa inversa SuperScript III (Invitrogen) y tampón de la transcriptasa inversa (1X), y se dejó incubando a 55°C durante 60 min. Finalmente, se inactivó la reacción incubando las muestras a 70°C durante 15 min.

El ADN complementario resultante se utilizó posteriormente para comprobar mediante PCR la ausencia de los genes delecionados.

3.3.1.4. Transfección transitoria de células en cultivo

Para llevar a cabo las transfecciones de células en cultivo, se hizo uso de Lipofectamina (Invitrogen) para monocapas celulares con una confluencia del 70-80% o Lipofectamina-2000 (Invitrogen) para monocapas celulares confluentes. El protocolo se llevó a cabo siguiendo las recomendaciones del fabricante y en todos los casos se utilizó ADN plasmídico a una concentración de 2,7 µg/10⁶células. Durante el proceso se empleó OPTIMEM como medio de transfección y para efectuar los lavados.

3.3.2. Técnicas de manipulación de virus

3.3.2.1. Generación de virus recombinantes de inserción

Para la construcción de recombinantes basados en el virus salvaje WR, se infectaron monocapas de células BSC40 cultivadas en placas p60 (NUNC) a una sub-confluencia del 70-80% a una multiplicidad de infección de 0,01 ufp/célula. Tras una hora de adsorción, se retiró el inóculo, se lavó dos veces con 4 ml de OPTIMEM y se llevó a cabo la transfección del plásmido de inserción correspondiente en forma de complejos de ADN-liposomas formados durante 20 min. a temperatura ambiente con 8 µg de ADN y 24 µl de lipofectamina en medio OPTIMEM. La mezcla se retiró 5 horas después de la transfección, se lavó dos veces con 4 ml de OPTIMEM, y se añadió DMEM completo suplementado con 2% de NCS. Cuando se observó efecto citopático se recogieron las células, se centrifugaron (1800 rpm – 5 min.), se resuspendieron en 1 ml de DMEM completo sin suero y se lisaron mediante tres ciclos sucesivos de congelación/descongelación. Con los extractos obtenidos previamente sonicados (programa de tres ciclos de 10 seg de sonicación y 10 seg de pausa; Sonicador “MISONIX INCORPORATED, S3000-010”) se infectaron nuevamente monocapas de

células BSC40 a diferentes diluciones y tras la adsorción se retiró el inóculo y se añadieron 3 ml de una mezcla 1:1 de agar (1.9%) y DMEM 2X suplementado con 2% NCS. 48 horas después, cuando las placas de lisis fueron visibles al microscopio, se añadió el sustrato correspondiente al marcador de selección del plásmido de inserción (X-Gal 0.03%) en 1 ml de agar (1.9%) y DMEM 2X (1:1) (Carroll & Moss, 1995; Chakrabarti *et al.*, 1985). Las placas de lisis que desarrollaron color azul, correspondientes a los virus recombinantes, fueron picadas, resuspendidas en 500 µl de DMEM y utilizadas como inóculo para infectar nuevos cultivos en monocapa de BSC40. El proceso de selección (plaqueos) se repitió al menos tres veces para placas azules, y dos veces para placas blancas que ya habían perdido el gen de selección. Una vez que se obtuvieron los virus recombinantes aislados, se generó un primer stock intermedio (Stock P1), para luego escalarlo y generar el stock de trabajo (Stock P2). Para confirmar la pureza de los virus recombinantes generados se llevó a cabo un análisis por PCR y también se evaluó la expresión y estabilidad de los antígenos. En el caso de los virus recombinantes que expresan luciferasa, se lisaron las células infectadas con los virus recombinantes con tampón de lisis (Promega) y se midió la actividad luciferasa en presencia de luciferina y ATP (“*Luciferase assay system*”; Promega) mediante la utilización de un luminómetro Lumat LB 9501 (Berthold Technologies), siguiendo las indicaciones del fabricante. En el caso de los vectores recombinantes para GFP, se evaluó su expresión mediante la observación directa en un microscopio de fluorescencia. Al finalizar la generación de los virus recombinantes, todos se analizaron por secuenciación para comprobar que la posición y las secuencias insertadas eran correctas.

3.3.2.2. Generación de virus mutantes de delección

Para la generación de los virus mutantes de delección, se siguió el mismo procedimiento descrito en el apartado anterior, aunque los plásmidos utilizados son diferentes y además se someten a digestión como paso previo a su transfección. Así, inicialmente se procedió a digerir los plásmidos de delección empleando la diana de restricción PstI (situada en la región codificante de DsRed2), facilitando de esta forma la selección de las placas de virus positivos para la delección (ya que sólo se seleccionan las placas positivas para la expresión de GFP) y disminuyendo el número de virus intermediarios derivados de las recombinaciones homólogas. El proceso de selección se basa en el seguimiento inicial de las placas positivas para GFP (3 plaques) y el seguimiento

posterior de placas que ya han perdido el gen de selección (2 plaqueos) (**Figura 8**). Una vez que se obtuvieron los virus mutantes de delección aislados, se generó un primer stock intermedio (Stock P1), para luego escalarlo y generar el stock de trabajo (Stock P2). Para confirmar la delección de los distintos genes y la pureza de los virus recombinantes se llevaron a cabo análisis mediante PCR y RT-PCR (según lo descrito en las secciones anteriores). Al finalizar la generación de los virus mutantes de delección, todos se analizaron por secuenciación para determinar que las delecciones se habían llevado a cabo correctamente.

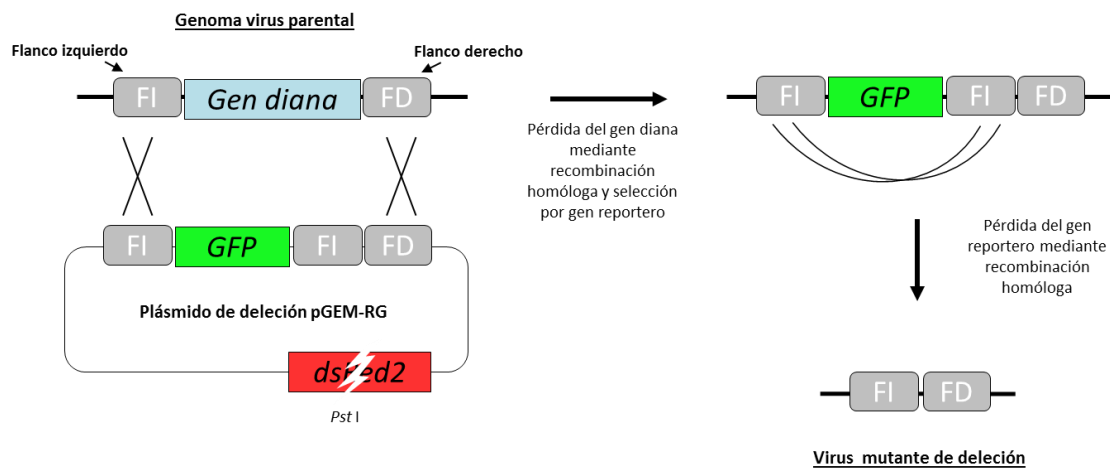


Figura 8. Estrategia de recombinación homóloga para la generación de virus mutantes de delección.

3.3.2.3. Purificación de virus

La purificación de los virus por gradiente de sacarosa se realizó de acuerdo con el método descrito inicialmente por Joklik (Joklik, 1962) y Esteban (Esteban, 1984). Para la infección con los virus WR se utilizaron células BSC40. Las distintas líneas celulares fueron infectadas a una multiplicidad de infección de 0,01 ufp/célula. Cuando se observó efecto citopático, se recogieron las células y se centrifugaron durante 10 min. a 2000 rpm a 4°C, el precipitado se lavó una vez con PBS y finalmente se resuspendió en tampón Tris-HCl 10 mM pH 9.0. A continuación, se realizaron dos ciclos de sonicación/centrifugación (tres pulsos de 10 segundos/1800 rpm durante 5 minutos). Los sobrenadantes recogidos en cada ciclo se centrifugaron (1 hora a 20000 rpm a 4°C, en rotor SW28, Beckman) sobre un colchón de sacarosa al 36% en Tris-HCl 10 mM pH 9.0. Los precipitados obtenidos se recogieron y se centrifugaron sobre otro colchón de sacarosa en las mismas condiciones. Los virus purificados se titularon, se comprobó la

ausencia de contaminación por bacterias (placas de agar/LB), hongos (placas de agar sangre) o micoplasmas (PCR), se fraccionaron en pequeños volúmenes y se congelaron a -80°C hasta su utilización.

3.3.2.4. Titulación de virus

Para la infección de los cultivos celulares y la titulación de virus se han empleado las técnicas habituales que aparecen descritas en *Current protocols in Molecular Biology* (L. & Moss, 1991).

La titulación de la cepa WR se realizó en la línea celular BSC40, empleando diluciones seriadas. A las 48 horas post-infección, se tiñeron las células con cristal violeta (Sigma) (0.5% -p/v- en metanol al 20% -v/v-), revelándose las placas de lisis. El título se refirió como unidades formadoras de placas por mililitro (ufp/ml).

3.3.2.5. Curvas de crecimiento de virus

Para evaluar la capacidad de replicación de los virus recombinantes generados en distintas líneas celulares, monocapas de células fueron infectadas a una multiplicidad de 0,01 ufp/célula con cada virus. Tras una adsorción de 60 min. a 37°C, se retiró el inóculo y se añadió medio DMEM suplementado con 2% FCS. A distintos tiempos post-infección (0, 8, 24, 32, 48 y 72 hpi) se recogieron las células infectadas (que fueron mantenidas a -80°C hasta su titulación) y se lisaron las células mediante tres ciclos de congelación/descongelación y sonicación. Las partículas virales fueron contabilizadas mediante tinción con cristal violeta (apartado 3.3.2.4.).

3.3.2.6. Evaluación del tamaño de placa de lisis

Para determinar el tamaño de las placas de lisis de los distintos virus, se llevó a cabo la infección de monocapas de células BSC40 a una multiplicidad de 0,005 ufp/célula, añadiendo medio sólido (DMEM 2x + agar 1,9%, 1:1 vol) tras retirar el inóculo; la infección se dejó durante 48 horas y posteriormente se analizaron las placas de lisis tomando micrografías con un microscopio ZEISS AXIO Vert.A1 usando la tecnología “Nikon Digital Sight DS-2Mv” para capturar las imágenes en formato TIFF. Para la comparación entre las placas de lisis de los distintos virus, se analizó el área de cada una según la fórmula “área = $(\pi) \times (\text{radio del eje mayor}) \times (\text{radio del eje menor})$ ”.

3.3.3. Técnicas de manipulación de proteínas

3.3.3.1. Análisis de proteínas en SDS-PAGE

Las muestras de proteínas fueron analizadas mediante electroforesis monodimensional en geles de poliacrilamida en presencia de SDS (SDS-PAGE desnaturalizantes) según el protocolo de Sambrook y cols (Green & Sambrook, 2012). El porcentaje de acrilamida varió dependiendo del peso molecular de la proteína de interés.

3.3.3.2. Transferencia de SDS-PAGE e inmuno-detección en membrana (Western Blot)

Para la transferencia de geles SDS-PAGE a membranas de nitrocelulosa se empleó el sistema húmedo (Mini Trans-Blot® Cell, Bio-Rad) siguiendo el protocolo descrito por el fabricante. El gel y la membrana de nitrocelulosa (GE Healthcare) pre-hidratada en tampón de transferencia se colocaron entre papeles Whatman-3MM® empapados en el tampón. La transferencia se efectuó a una intensidad de corriente constante de 400-200 mA durante 50 min. Se verificó la transferencia mediante tinción reversible con el colorante rojo Ponceau (0.2% Ponceau en 3% TCA; Sigma).

A continuación, la membrana de nitrocelulosa se saturó con una solución de BSA al 5% (p/v) en TBS-T (Tween-20 0,01% -v/v-, Sigma) a temperatura ambiente con agitación suave durante 40 min. La incubación con los diferentes anticuerpos se efectuó en esa misma solución de saturación. El anticuerpo primario se incubó a 4°C durante 16 horas mientras que la incubación con el anticuerpo secundario se realizó durante 90 min. a temperatura ambiente. Los lavados intermedios se realizaron en TBS-T con agitación a temperatura ambiente durante 15 min.

El revelado de las bandas de proteína reconocidas por los anticuerpos correspondientes se efectuó mediante el sistema luminol ECL® (Amersham), exponiendo una película autorradiográfica “Carestream Kodak BioMax XAR” (Kodak).

3.3.3.3. Análisis de la expresión de luciferasa en células infectadas *in vitro*

Las monocapas infectadas de células BSC40 se lisaron en tampón de extracción de luciferasa (Promega) y la actividad luciferasa se midió en presencia de luciferina y ATP en un luminómetro Lumat LB 9501 (Berthold Technologies) siguiendo las indicaciones

del fabricante (“Luciferase Assay System”, Promega). La señal de luciferasa se expresó como Unidades Relativas de Luz (URL) por segundo. La cantidad de proteína total en cada una de las muestras analizadas rondaba los 20 µg. La cantidad de proteína total en las células infectadas se determinó utilizando el kit comercial BCA (Pierce Biotechnology).

3.3.3.4. Análisis de intensidad de señal en los ensayos de inmunodetección en membrana

El análisis densitométrico se realizó usando el programa Image J (NHI Image) a partir de una imagen digitalizada de las películas autorradiográficas de los Western Blots. Se siguieron las indicaciones del fabricante del software para dicho análisis (<https://imagej.nih.gov/ij/docs/menus/analyze.html#gels>). De esta forma, a partir de la imagen en escala de grises a 8-bit, se dibujaron rectángulos iguales sobre cada carril de proteínas a analizar. Con las herramientas del software se generaron gráficos representando la intensidad de cada banda y se calculó su área bajo la curva, obteniéndose así la intensidad relativa.

3.3.4. Técnicas inmunológicas

3.3.4.1. Determinación de la respuesta inmune específica de células T secretoras de IFN γ por el ensayo de ELISpot

Para detectar las células T secretoras de IFN γ específicas de antígeno se utilizó el ensayo de ELISpot (Miyahira *et al.*, 1995). En resumen, placas de 96 pocillos con fondo de nitrocelulosa (Millipore) se cubrieron con 75 µl/pocillo de una solución del anticuerpo monoclonal de rata anti-IFN γ murino (clon R4-6A2, Pharmingen, San Diego, CA) a una concentración de 6 µg/ml en PBS. Tras incubarlo toda la noche a temperatura ambiente, se lavaron los pocillos tres veces con medio RPMI y finalmente se incubó con medio suplementado con 10% FCS durante al menos una hora a 37°C en atmósfera de CO₂ al 5%. Los bazos de los animales inmunizados se recogieron en medio RPMI + 10% FCS y se homogenizaron mediante disgregación mecánica a través de un separador celular de 40 µm (Falcon). Las células disgregadas se centrifugaron durante 5 min. a 1500 rpm a 4°C y se lavaron dos veces con RPMI + 10% FCS. Se lisaron los eritrocitos añadiendo NH₄Cl 0,1 M (2 ml/bazo) durante 5 min. en hielo. Transcurrido este tiempo, se añadió RPMI + 10% FCS y se centrifugó, se lavó dos

veces más con RPMI + 10% FCS y finalmente las células se resuspendieron en 5 ml de RPMI + 10% FCS. Se contó el número de esplenocitos vivos mediante tinción con azul tripán (4% en agua; Sigma).

Las células presentadoras profesionales (APC²) utilizadas en este ensayo fueron las propias presentadoras del bazo. Para evaluar la respuesta específica frente a los distintos antígenos, 10⁶ esplenocitos por condición se reestimularon con los péptidos sonicados (programa de tres ciclos de 10 seg de sonicación y 10 seg de pausa) (B8R_{TSYKFESV}: 10 µg/ml; TRP-2_{SVYDFVWL}: 1 µg/ml; gp100_{KVPRNQDWL}: 1 µg/ml). En el caso de los esplenocitos estimulados con el péptido de B8R se realizaron diluciones 1/3. Las placas se incubaron durante 48 horas a 37°C en atmósfera de CO₂ al 5%, se lavaron 5 veces con PBS-T, y se incubaron con 2 µg/ml del anticuerpo monoclonal de rata anti-IFN γ murino biotinilado XMG1.2 (Pharmingen) diluido en PBS-T (PBS con Tween-20 0,05% -v/v-, Sigma), durante 2 horas a temperatura ambiente. Posteriormente, se lavaron las placas 5 veces con PBS-T y se añadió una dilución 1/800 de avidina-peroxidasa (0,5 mg/ml; Sigma). Tras 1 hora a temperatura ambiente, se lavó 3 veces con PBS-T y dos con PBS, añadiéndose finalmente la mezcla de revelado: 1 µg/ml del sustrato DAB (Sigma), resuspendido en Tris-Cl 50 mM pH 7,5, 0,015% de H₂O₂. La reacción se detuvo lavando la placa con abundante agua y una vez seca se realizó el recuento de los puntos empleando el lector de placas “ELISpot Reader System -ELR02-” (AID – Autoimmun Diagnostika GmbH) con la ayuda del software AID ELISpot reader system (Vitro).

3.3.4.2. Análisis de poblaciones celulares en respuesta innata

3.3.4.2.1. Análisis de poblaciones celulares en exudados peritoneales

Para analizar las poblaciones de células del sistema inmune que migran desde o hacia la cavidad peritoneal en la respuesta innata frente a los distintos vectores virales generados, los ratones recibieron 1x10⁷ ufp/ratón (i.p.) (jeringa de 1 ml – 25G, BD Tuberculin) y tras 3, 6 o 12 horas los animales se sacrificaron y se les realizó un lavado peritoneal inyectando 6 ml de PBS (2% FCS) con una aguja de 25G (BD Microlance 3) y recogiendo el volumen con una aguja de 21G (BD Microlance 3) (en todos los casos se anotó el volumen recogido para el cálculo posterior del número total de células). Los exudados peritoneales se centrifugaron a 1500 rpm durante 5 min a 4°C, después el botón de células se lavó una vez con PBS (1500 rpm, 5 min 4°C), se resuspendió en 500

μl de PBS (2% FCS) y se contó el número de células viables en cada una de las muestras. Se transfirieron 200 μl a dos pocillos de una placa de 96 con el fondo en “v” y se lavaron una vez con “PBS Staining” (PBS 1x, 0,5% BSA, 1% FCS, 0,065% Azida sódica y 2 mM EDTA). A continuación, se añadió FcBlock diluído 1:250 en “PBS Staining” y se incubó 15 min a 4°C en oscuridad. Se realizó otro lavado y se procedió a la incubación con los marcadores de superficie específicos diluidos según el lote de cada anticuerpo empleando 40 μl /muestra durante 20 min a 4°C en oscuridad. Finalmente, se lavaron las células 2 veces y se resuspendieron en 200 μl de “PBS Staining”. Las muestras fueron analizadas utilizando un citómetro Gallios (Beckman Coulter). Como estrategia de selección, se seleccionaron inicialmente las células positivas para CD45 y posteriormente se estableció cada una de las poblaciones según la combinación de marcadores mostrada en la **Tabla 5**. Para la representación de los datos, el número total de células para cada tipo celular analizado se calculó teniendo en cuenta los porcentajes de cada una de las poblaciones seleccionadas (según la estrategia de selección), corrigiendo con la proporción “volumen inyectado / volumen recogido”.

Tipo celular	Marcadores
Neutrófilos	CD11b ⁺ / Ly6G ⁺
Monocitos	F4/80 ^{med} / CD11b ^{med}
Macrófagos	F4/80 ^{alt} / CD11b ^{alt}
Células dendríticas	CD11c ⁺ / I-A/I-E ⁺
Células NK	NKP46 ⁺ / CD3 ⁻
Células NKT (“Natural Killer” T)	NKP46 ⁺ / CD3 ⁺
Linfocitos T CD4	CD4 ⁺ / CD3 ⁺
Linfocitos T CD8	CD8 ⁺ / CD3 ⁺
Linfocitos B	CD11b ⁺ / CD19 ⁺

Tabla 5. Relación de tipos celulares y marcadores empleados para su identificación. Todos los tipos celulares fueron seleccionados previamente como CD45⁺. Los niveles de expresión de los marcadores específicos se han identificado como: “^{med}” nivel de expresión medio; “^{alt}” nivel de expresión alto; “⁺” eventos positivos para ese marcador; y “⁻” eventos negativos para la expresión de ese marcador.

3.3.4.2.2. Análisis de poblaciones celulares en tumor y bazo

Una vez que los tumores alcanzaron el criterio de punto final de cada ensayo, se sacrificaron los ratones y se extirparon los tumores, prestando especial atención en extraer la masa tumoral completa y limpia de tejido adyacente. A continuación, los tumores se trocearon en fragmentos de 0,5-1 mm de diámetro empleando pinzas y bisturí, y se incubaron con 2 ml/tumor de solución de disociación (DMEM completo, Colagenasa VIII 200 U/ml –Sigma-Aldrich– y DNasa I 100 µg/ml –Roche–) durante 30 min a 37°C en noria (inclinación 45°), y agitando en vortex cada 10 min. Transcurrido el tiempo de incubación, las muestras se filtraron con un separador celular de 40 µm y se lavaron 2 veces con PBS 2% FCS (1500 rpm, 5 min, 4 °C) (protocolo modificado de (Watkins *et al.*, 2012)). Finalmente, se dejaron las células en 420 µl de PBS 2% FCS, se contaron y se transfirieron 180 µl de cada muestra a 2 pocillos de una placa de 96 pocillos con fondo cónico. Las células se lavaron una vez con “PBS Staining”, se añadió FcBlock diluído 1:250 en “PBS Staining” y se incubó 15 min a 4°C en oscuridad. Se realizó otro lavado y se procedió a la incubación con los marcadores de superficie diluidos según el lote de cada anticuerpo empleando 40 µl/muestra durante 20 min a 4°C en oscuridad. Finalmente, se lavaron las células 2 veces y se resuspendieron en 200 µl de “PBS Staining”. Las muestras fueron analizadas utilizando un citómetro Gallios (Beckman Coulter) y siguiendo los criterios de selección de los distintos tipos celulares descritos en la **Tabla 5** y añadiendo los marcadores CD69 y CD279 para la caracterización de los linfocitos T.

En el caso del procesado de los bazos, éstos se extrajeron y se procesaron según se ha descrito en el apartado 3.3.4.1. Una vez se tienen las células del bazo en suspensión, se aplica el mismo tratamiento, marcaje y estrategia de análisis que los empleados con las muestras de los tumores procesados.

3.3.5. Generación de esferoides de células tumorales

Los esferoides de células tumorales constituyen un modelo para el crecimiento de líneas celulares tumorales en 3 dimensiones, y se han empleado como paso intermedio entre los experimentos en líneas celulares cultivadas en monocapa y los experimentos en animales (Hirschhaeuser *et al.*, 2010; Rodríguez-Enriquez *et al.*, 2008).

Para la generación de estos esferoides, se prepararon placas de 12 pocillos a las que se les añadió el día previo al inicio del protocolo 1 ml de agar 1,9% en PBS; una vez solidificado el agar, se añadió 1 ml de PBS adicional para mantener hidratada la capa de agar y se dejó a 4°C. Al día siguiente, se retiró el PBS, se añadió 1 ml de DMEM (para las células TRAMP-C1) y se dejó en el incubador a 37°C durante 2 horas. Durante el tiempo de incubación, las células TRAMP-C1 se trataron con tripsina, se contaron y se diluyeron para dejarlas a una concentración de $2,5 \times 10^5$ células/ml; se añadió 1 ml de la suspensión de células a cada pocillo de M12 con la capa de agar y se dejaron en el incubador a 37°C en atmósfera de CO₂ al 5% y en agitación suave en un agitador orbital. El seguimiento del crecimiento de los esferoides se realiza midiendo su tamaño mediante fotografías realizadas con una cámara acoplada a un microscopio; una vez que los esferoides han alcanzado el tamaño requerido para empezar el experimento, éstos se infectan y se miden cada 2 días hasta el punto final del experimento. Protocolo para la generación de los esferoides: modificado de (Friedrich *et al.*, 2009; Rodriguez-Enriquez *et al.*, 2008).

3.3.6. Inmunohistoquímica

Los esferoides infectados fueron fijados en paraformaldehído 4% (en PBS) durante 12 horas a 4°C, lavados 3 veces con PBS y mantenidos en etanol al 70% (en H₂O) a 4°C. A continuación, se deshidrataron, se embebieron en parafina y se realizaron cortes sucesivos de 5 µm. Para los estudios de histopatología, parte de las secciones se tiñeron con hematoxilina y eosina. El corte y la tinción de las muestras se llevaron a cabo por el “Servicio de Histología” del Centro Nacional de Biotecnología. Las imágenes se tomaron con un microscopio ZEISS AXIO Vert.A1 usando la tecnología “Nikon Digital Sight DS-2Mv” para capturar las imágenes en formato TIFF.

3.3.7. Manipulación de animales

Todos los ensayos *in vivo* se han llevado a cabo empleando ratones hembras C57BL/6 (Harlan) de 6-8 semanas de edad.

3.3.7.1. Protocolos de inmunización

En los ensayos de biodistribución de los diferentes virus mutantes los animales fueron inmunizados con 2×10^7 ufp/ratón por vía intraperitoneal en un volumen final de 200 µl de PBS (jeringa de 1 ml – 25G, BD Tuberculin).

Para los ensayos de supervivencia y la determinación del grado de patogénesis inducido por los virus mutantes, los animales fueron anestesiados con isoflurano (IsoFlo, Esteve) e inoculados por vía intranasal con 5×10^6 ufp/ratón de WR ó 5×10^6 ó 5×10^7 ufp/ratón de los virus recombinantes en un volumen final de 20 μ l de PBS. Las inoculaciones intranasales se realizaron empleando la micropipeta de 2-20 μ l. El método de evaluación de los síntomas de enfermedad en animales infectados se basa en un número de 2 cifras, donde la primera cifra corresponde a los signos generales de enfermedad del ratón (incluyendo movilidad, acicalamiento y aspecto general) y la segunda corresponde a los problemas que los ratones pueden experimentar al respirar; los síntomas se evaluaron del 1 al 4: dando un “1” a la ausencia de síntomas y un “4” a un grado severo de la afección por la infección del virus. Se consideró criterio de punto final cuando se registraba una pérdida de peso del 25% o cuando un animal alcanzaba un valor de 4 en cualquiera de los dos signos de enfermedad evaluados.

Para los ensayos de protección, ratones de 7 semanas fueron inoculados con 5×10^5 células B16F10 mediante administración intradérmica (inóculo de 50 μ l/ratón en PBS) empleando jeringas de insulina de 0,3 ml – 30 G (BD Micro-fineTM+). Una vez que los tumores hubieron alcanzado un volumen de 40-50 mm³, se administró a los animales 1×10^8 ufp/ratón de virus mediante inyección por vía intratumoral empleando jeringas de insulina de 0,3 ml – 30 G (inóculo de 10 μ l/ratón en PBS). El seguimiento de los animales se realizó diariamente mediante la medida de los tumores con un calibre (Mauser digital 2), el estado general de salud de los animales y su peso. El volumen de los tumores se calculó siguiendo la fórmula “Volumen = (largo x (ancho)²) / 2”. El criterio de punto final varió dependiendo del experimento pero siempre atendiendo a un volumen de 1400-1500 mm³ como volumen máximo de tumor.

Las inoculaciones de las células y virus, así como la toma de medidas de los tumores se llevaron a cabo anestesiando los animales con isoflurano en una cámara acoplada a un vaporizador de flujo continuo (Isotec 5, Datex-Ohmeda) y empleando una mezcla de oxígeno (flujo: 1,5 l/min) e isoflurano (FORANE ®, AbbVie Farmaceútica S.L.U.).

3.3.7.2. Obtención de muestras animales

Para los ensayos en los que se analiza la respuesta inmune, se les extrajo el bazo. En el ensayo de biodistribución se extrajeron para su análisis los ovarios, el cerebro y se realizaron lavados peritoneales. Para los experimentos en los que se estudió la

efectividad del tratamiento con virus en tumores, se extrajeron el bazo y los tumores (apartado 3.3.4.2.2.). Para los ensayos de migración y análisis de la respuesta innata en las poblaciones celulares en exudados peritoneales, se llevaron a cabo lavados peritoneales según se describe en el apartado 3.3.4.2.1.

3.3.7.3. Procesado de órganos en el ensayo de biodistribución

En el ensayo de biodistribución, los distintos órganos se congelaron en hielo seco inmediatamente después de su extracción. Para su procesamiento, se añadió DMEM completo a cada órgano (300 µl para todos los órganos, incluidas las células obtenidas de los exudados peritoneales) y se homogeneizaron empleando un homogeneizador VDI 12 (VWR) con un cabezal S12N-5S (VWR). Los órganos procesados se sometieron a 3 ciclos de congelación (-80°C) / descongelación (37°C) y un ciclo de sonicación previamente a su posterior titulación y cuantificación de proteína total. El título de virus en cada uno de los órganos se expresó como Unidades formadoras de placas por mg de proteína. La cantidad de proteína total en los tejidos se determinó utilizando el kit comercial BCA (Pierce Biotechnology) siguiendo las recomendaciones del fabricante.

3.3.8. Análisis estadístico

El análisis estadístico de los datos para determinar la significancia de las diferencias encontradas entre los distintos grupos se realizó mediante el test de análisis de la varianza (ANOVA de un factor) con la corrección de Bonferroni para comparaciones múltiples. Se consideraron significativos valores de p menores de 0,05: *, $p < 0,05$, **, $p < 0,01$, ***, $p < 0,005$.

4. Resultados

4.1. Generación de virus mutantes de delección y/o recombinantes.

Con el objetivo de modificar el virus replicativo WR para su uso como un agente oncolítico seguro, se decidió llevar a cabo la delección de los genes *A48R* y *J2R* (metabolismo de nucleótidos), *B18R* (bloqueo de la respuesta de la célula a la infección), *C11R* (factor mitogénico), *C16L* (contexto de hipoxia inducida) y *FIL* (inhibición de apoptosis). Para ello, se llevaron a cabo los protocolos de generación de virus mutantes de delección y de virus recombinantes descritos en los apartados 3.3.2.1. y 3.3.2.2. de materiales y métodos.

Una vez generado el virus recombinante WR- Δ A48R- Δ B18R- Δ C11R (nombrado a partir de ahora como WR- Δ 3) mediante la delección secuencial de los genes sobre el virus parental WR, se comprobó la correcta delección de dichos genes mediante PCR utilizando tanto oligonucleótidos internos para los genes diana como oligonucleótidos que hibridan en las regiones flanqueantes de los genes correspondientes (**Figura 9.A**). De esta forma, cuando se realiza la PCR empleando oligonucleótidos específicos del gen diana, se puede comprobar la ausencia de amplificación en la muestra de WR- Δ 3 para los genes *A48R* (**Figura 9.B**), *B18R* (**Figura 9.C**) y *C11R* (**Figura 9.D**) en contraposición con la muestra del virus salvaje WR que muestra amplificación para los 3 genes. Asimismo, se puede observar la correcta delección de los genes cuando se emplean los oligonucleótidos específicos para las regiones flanqueantes, donde se aprecia la diferencia en el tamaño de los productos amplificados en la muestra de WR- Δ 3 cuando se comparan con el virus parental salvaje WR (**Figura 9.B-D**).

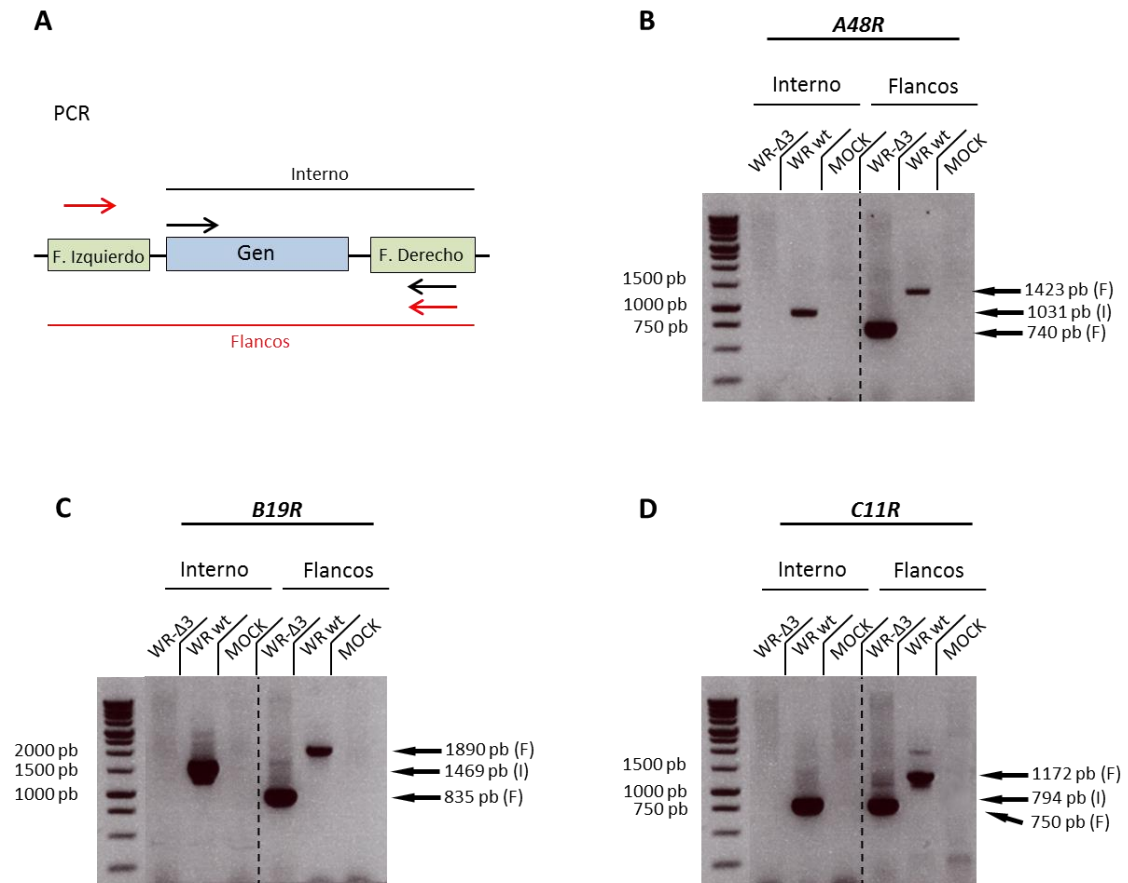


Figura 9. Comprobación por PCR de las deleciones en el virus mutante de deleción WR-Δ3. A) Estrategias de amplificación por PCR. Se han empleado dos parejas de oligonucleótidos, una de ellas específica para la secuencia del gen diana + el flanco derecho del gen, y la otra específica para las regiones flanqueantes empleadas para la deleción de los genes en el genoma viral. B-D) Amplificación por PCR empleando oligonucleótidos específicos (interno y flanqueantes) para los genes *A48R*, *B18R* y *C11R*, comparando los productos obtenidos de WR-Δ3 con los de WR salvaje. En los tamaños de los fragmentos indicados a la izquierda de los geles, se indican los correspondientes a la amplificación con oligonucleótidos internos como “(I)” y los correspondientes a la amplificación con oligonucleótidos de las regiones flanqueantes como “(F)”. A la derecha de los geles se indica el tamaño de las bandas correspondientes al marcador de pb utilizado. Para la obtención del ADN genómico, se utilizaron células BSC40 no infectadas (mock) o infectadas a una mdi de 1 ufp/célula.

A continuación, y utilizando el virus WR-Δ3 como parental, se generó el virus recombinante que expresa luciferasa (WR-Δ3-Luc) mediante su inserción en el locus TK (*J2R*). Como se observa en la **Figura 10.A**, la amplificación por PCR empleando

oligonucleótidos específicos para las regiones flanqueantes del locus TK muestra un aumento en el tamaño del producto amplificado, lo que indica la correcta inserción del gen de la luciferasa y la delección del gen *J2R* (2106 pb). Igualmente, se evaluó la correcta expresión del gen de la luciferasa mediante la metodología descrita en el apartado 3.3.3.3., observándose altos niveles de expresión en comparación con virus salvaje WR y con el fondo que se obtiene en las células BSC40 sin infectar (**Figura 10.B**).

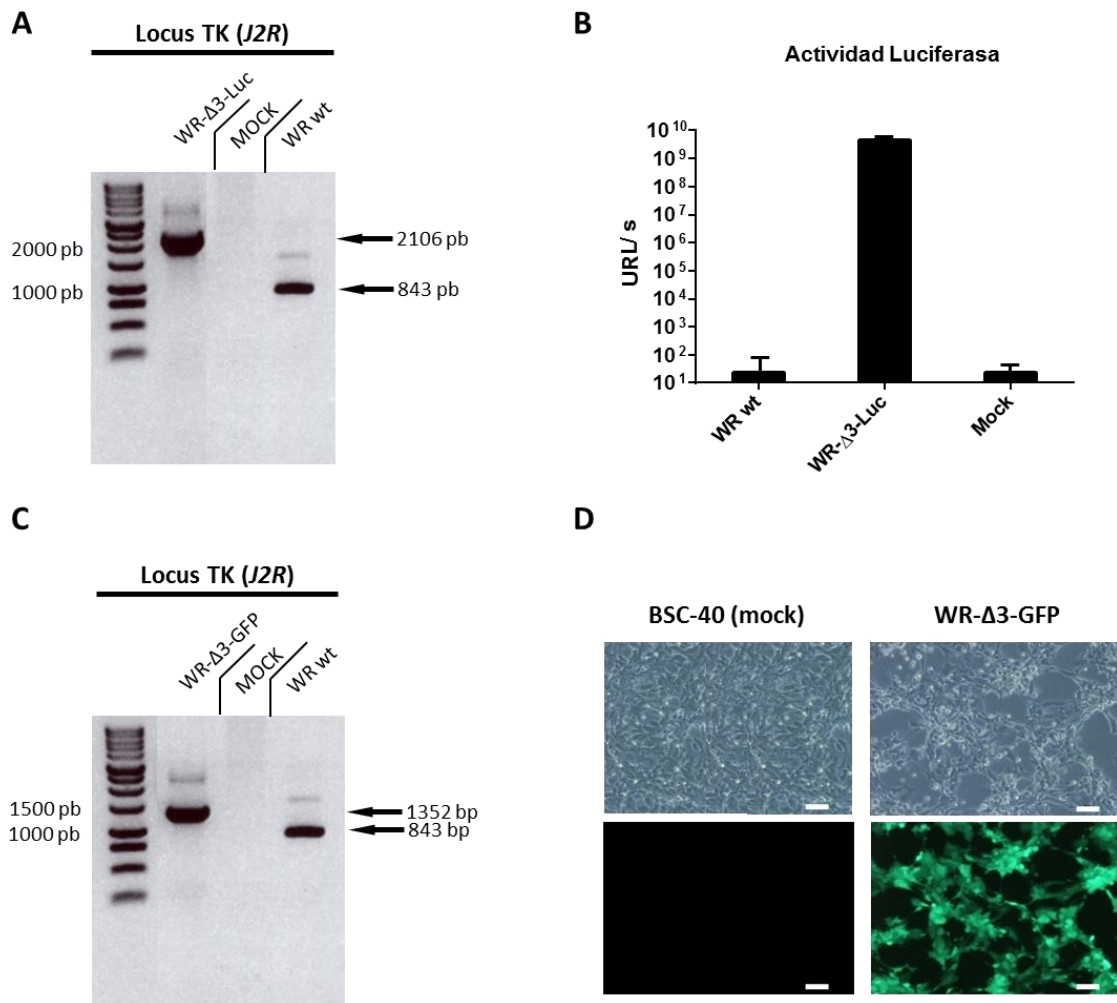


Figura 10. Comprobación de la correcta inserción de los genes reporteros luciferasa y GFP en los virus WR-Δ3-Luc y WR-Δ3-GFP. La correcta generación del virus recombinante WR-Δ3-Luc se comprobó por PCR empleando oligonucleótidos específicos para los flancos del gen *J2R* (A), y midiendo la actividad luciferasa en células BSC40 no infectadas (mock) o infectadas con WR salvaje o WR-Δ3-Luc (B) (la actividad luciferasa aparece expresada como unidades relativas de luz por segundo). En el caso del virus WR-Δ3-GFP, la inserción del gen GFP se comprobó por PCR

empleando oligonucleótidos específicos del locus TK de vaccinia (C), y se comprobó la expresión del gen reportero empleando un microscopio de fluorescencia (D) (los paneles superiores muestran las células en campo claro y los inferiores las células en el microscopio de fluorescencia con filtro para GFP) (barra de escala: 100 μm). En las fotografías de los geles de agarosa (A y C), se muestran los tamaños de los fragmentos resultantes de la amplificación a la izquierda; y el tamaño de las bandas correspondientes al marcador de pb utilizado a la derecha. Para la obtención del ADN genómico, se utilizaron células BSC40 no infectadas (mock) o infectadas a una mdi de 1 ufp/célula. En la gráfica se representa la media de los valores y la desviación estándar.

De la misma forma se generó el virus WR- Δ 3-GFP mediante la inserción del gen codificante para GFP en el locus TK. Su correcta inserción se comprobó por PCR (**Figura 10.C**), donde se puede observar el mayor tamaño del producto de amplificación utilizando los flancos de *J2R* (1352 pb) en comparación con el virus salvaje WR (843 pb). La correcta expresión de GFP se analizó mediante microscopía de fluorescencia, donde se observaba señal positiva en las células infectadas con el virus recombinante, en comparación con la ausencia de señal en las células BSC40 no infectadas (**Figura 10.D**).

Los virus mutantes de delección para *FIL* y *C16L* siguieron el mismo proceso de generación y comprobación que su parental WR- Δ 3; así se puede observar mediante PCR la correcta delección de los genes diana por el menor tamaño de los productos de amplificación obtenidos con oligonucleótidos específicos para las regiones flanqueantes encontrando en el caso de *FIL* un fragmento de 543 pb (**Figura 11.A**) y en el caso de *C16L* un fragmento de 676 pb (**Figura 11.B**) frente a los fragmentos observados en el virus salvaje WR de 1410 pb y 1512 pb, respectivamente.

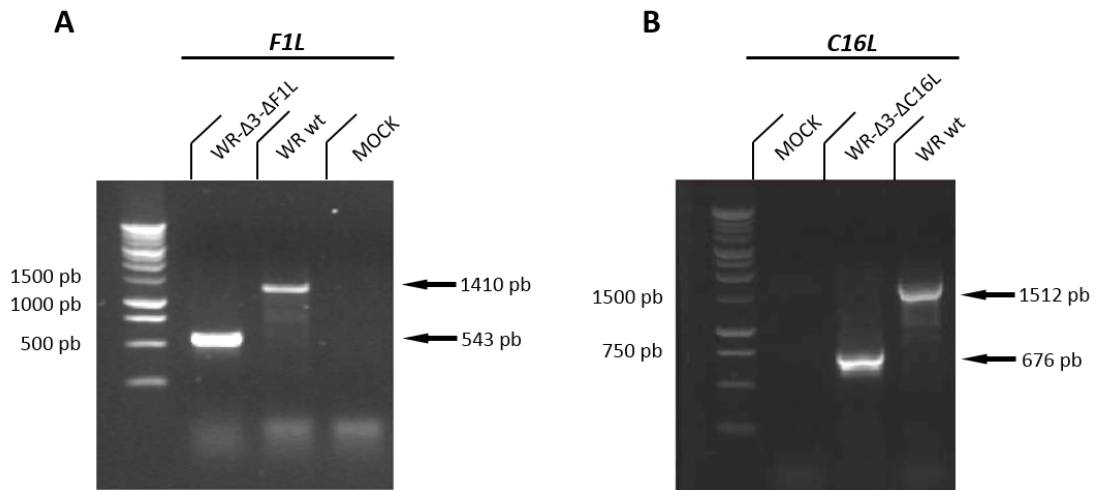


Figura 11. Comprobación por PCR de las deleciones en los virus mutantes de deleción WR- Δ 3- Δ F1L y WR- Δ 3- Δ C16L. Como estrategia de amplificación por PCR se utilizan parejas de oligonucleótidos específicas para las regiones flanqueantes de los genes *F1L* (A) y *C16L* (B), comparando los productos de PCR con los de WR salvaje. En las fotografías de los geles de agarosa se muestran los tamaños de los fragmentos resultantes de la amplificación a la izquierda y el tamaño de las bandas correspondientes al marcador de pb utilizado a la derecha. Para la obtención del ADN genómico se utilizaron células BSC40 no infectadas (mock) o infectadas a una mdi de 1 ufp/célula.

Para determinar que ninguno de los virus recombinantes generados presentaba alguna contaminación con virus parental que no se hubiese detectado por PCR convencional de ADN genómico, se analizaron en todos los stocks de virus las regiones adyacentes a los genes diana delecionados/insertados mediante secuenciación obteniendo como resultado las correctas deleciones e inserciones sin modificaciones aberrantes en las secuencias flanqueantes de los virus generados (resultados no mostrados). Además, para las deleciones de los genes *C11R* y *C16L*, genes que se encuentran en las regiones terminales repetidas del genoma del virus vaccinia, también se comprobó su completa deleción mediante el análisis a nivel de transcripción por RT-PCR. Tal y como se puede observar en la **Figura 12**, de todos los ADN complementarios analizados por PCR con oligonucleótidos específicos para cada uno de los genes delecionados, únicamente se obtuvieron productos de amplificación en el virus salvaje WR (*C11R*: 422 pb; *C16L*: 995 pb). Para determinar la ausencia de contaminación por parte de ADN genómico, las muestras de ARN sin tratar con la enzima transcriptasa reversa se sometieron a las

mismas PCRs que las muestras de ADN complementario, resultando todas negativas para las amplificaciones (resultados no mostrados).

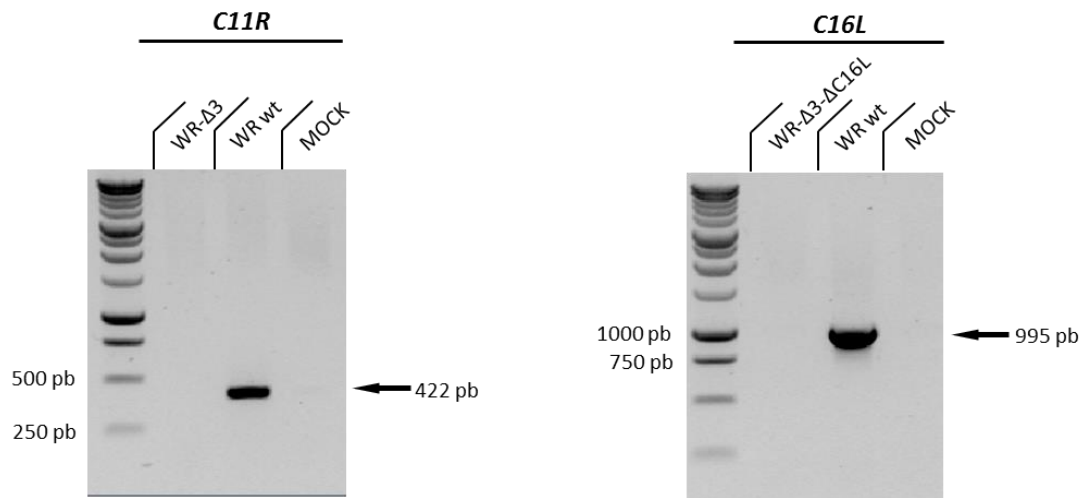


Figura 12. RT-PCR de los genes duplicados *C11R* y *C16L* delecionados en los virus generados. En la figura se muestra el resultado de la amplificación por PCR de los ADN complementarios obtenidos de la transcripción reversa del ARN obtenido de células BSC40 infectadas a una mdi de 1 ufp/célula con los virus WR-Δ3 (para *C11R*) y WR-Δ3-ΔC16L (para *C16L*). Para la amplificación por PCR se han empleado oligonucleótidos específicos de los genes diana.

4.2. Análisis del crecimiento de los virus mutantes de deleción y/o recombinantes generados.

4.2.1. Análisis del tamaño de placa de los virus mutantes de deleción en monocapas celulares.

Para determinar si la deleción o inserción de genes tiene algún efecto sobre el crecimiento de los virus generados, uno de los parámetros a analizar es si el tamaño de placa se ha visto afectado, lo que podría indicar una interferencia en la propagación del virus hacia células adyacentes, problemas en la replicación viral o citotoxicidad.

Para analizar dicho parámetro, las placas de lisis se observaron en campo claro a las 48 hpi y según se puede observar en la **Figura 13.A** ninguna de las deleciones e inserciones efectuadas afecta al tamaño de placa de los virus generados; además, no se encuentran diferencias significativas entre los virus, tal y como se puede corroborar cuando se compara el área de las placas de lisis (**Figura 13.B**). Por lo tanto, de estos

resultados puede concluirse que los genes deletados o insertados no afectan a la propagación viral a nivel del tamaño de la placa de lisis.

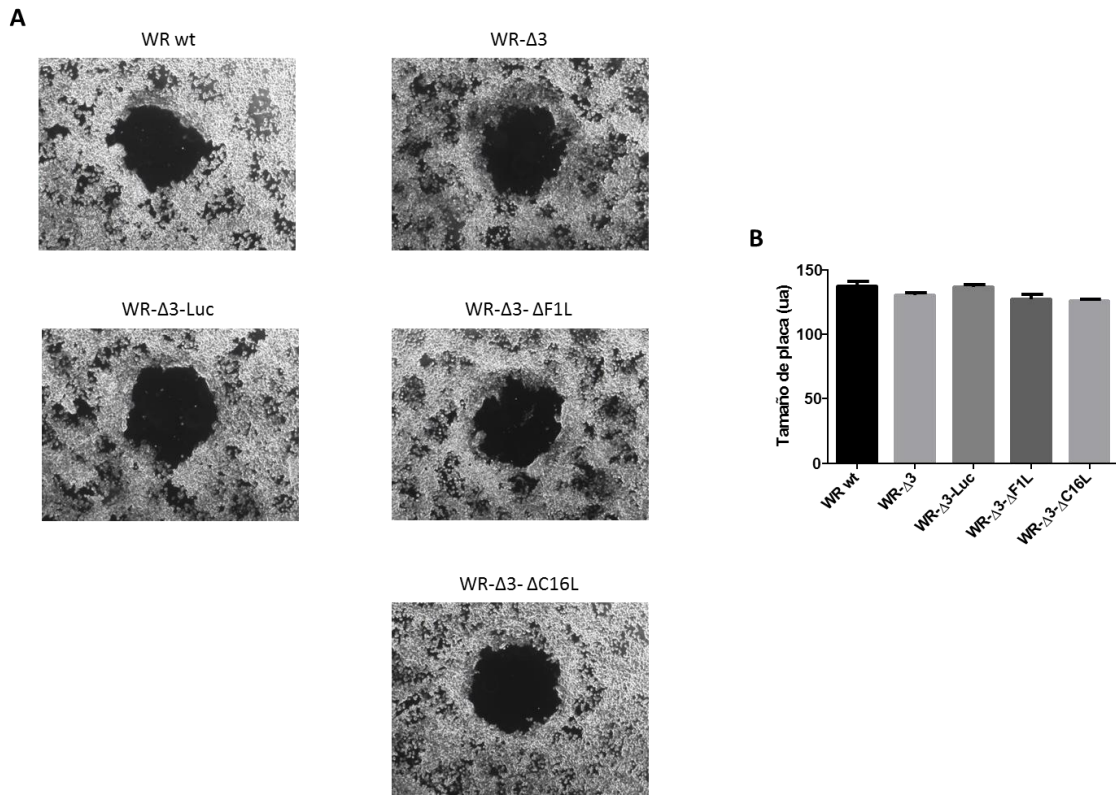


Figura 13. **Comparación en monocapas celulares del tamaño de las placas de lisis formadas.** A) Monocapas de células BSC40 infectadas a una multiplicidad de 0,005 ufp/célula en medio sólido y analizadas a las 48 hpi. Las imágenes de las placas de lisis fueron tomadas con un microscopio ZEISS AXIO Vert.A1 usando la tecnología “Nikon Digital Sight DS-2Mv” para capturar las imágenes en formato TIFF. B) Comparación del tamaño de las placas de lisis expresada en unidades arbitrarias (número de placas de lisis/virus medidas = 10). En la gráfica se representa la media de los valores y la desviación estándar.

4.2.2. Análisis de la capacidad de crecimiento y replicación de los virus recombinantes en distintas líneas celulares.

A continuación se analizó la capacidad replicativa de los virus recombinantes generados ya que este parámetro, al igual que el tamaño de la placa de lisis, es un indicador de los efectos que las deletaciones e inserciones llevadas a cabo pueden tener sobre el curso normal de la infección.

Para ello, se realizaron curvas de crecimiento en distintas líneas celulares infectando con los distintos virus recombinantes a una multiplicidad de infección de 0,01 ufp/célula, recogiendo las monocapas infectadas a distintos tiempo post-infección y llevando a cabo su titulación. Se recogieron conjuntamente las células infectadas y los sobrenadantes, de forma que se obtuvieron valores de títulos virales totales (incluyendo tanto las partículas virales asociadas a las células como las partículas virales liberadas al medio extracelular).

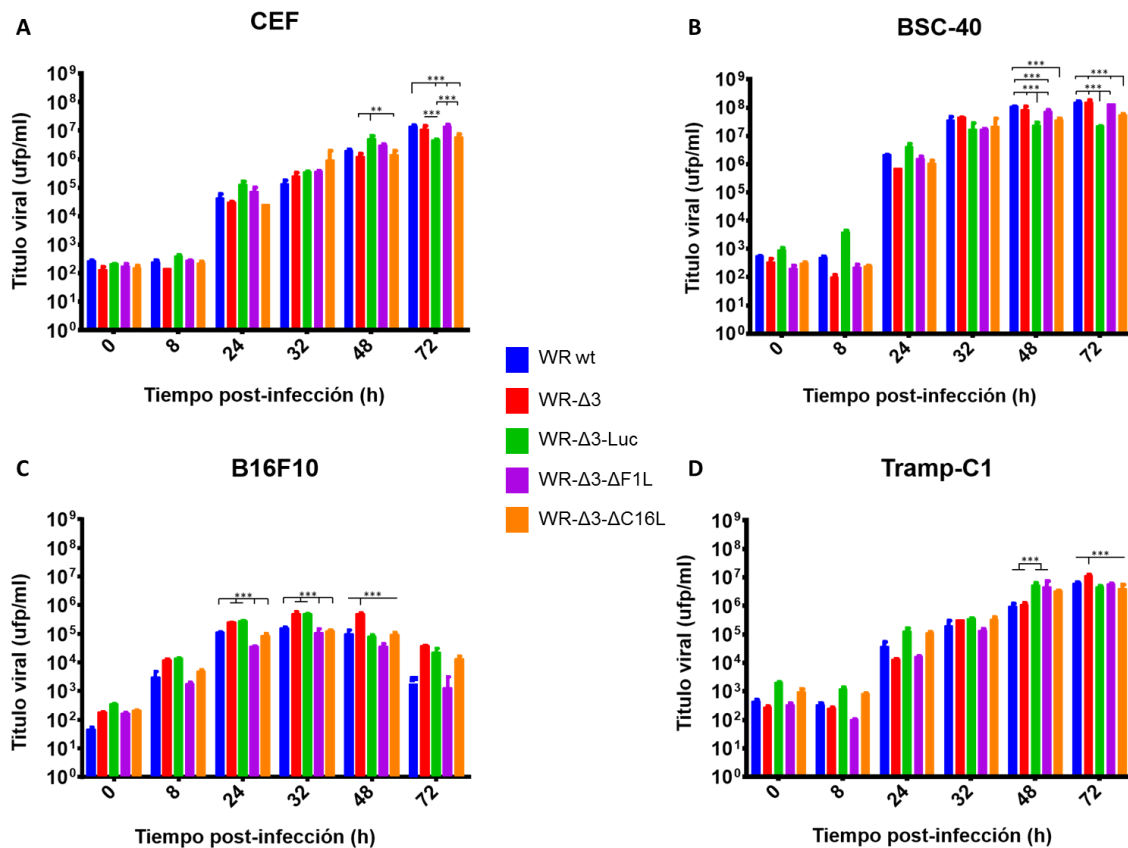


Figura 14. **Curvas de crecimiento de los virus mutantes de delección.** Estudio de la capacidad replicativa de los virus recombinantes generados en comparación con el virus parental salvaje WR en la línea celular primaria CEF (A), la línea inmortalizada BSC40 (B) y las líneas tumorales B16F10 (C) y TRAMP-C1 (D). Las infecciones a tiempo 0 hpi se llevaron a cabo por duplicado a una multiplicidad de 0,01 ufp/célula y las muestras se recogieron a 0, 8, 24, 32, 48 y 72 hpi, se congelaron/descongelaron 3 veces, se sonicaron y se titularon en monocapas de células BSC40. En las gráficas se representa la media de los valores y la desviación estándar. La comparación entre virus se llevó a cabo mediante el test ANOVA: **, $p < 0,01$; *** $p < 0,005$.

Tal y como se puede observar en la **Figura 14**, todos los virus presentan un perfil de replicación global similar, de forma que se observa un crecimiento en el título viral obtenido según aumenta el tiempo de infección en las líneas celulares CEF, BSC40 y TRAMP-C1. Sin embargo, los datos obtenidos en la línea tumoral B16F10 muestran un perfil de crecimiento distinto al observado en el resto de las líneas celulares, alcanzando títulos de virus más bajos con el pico de mayor título viral a las 32 horas post-infección y disminuyendo a partir de este punto. Asimismo, en cuanto el análisis comparativo se enfoca sobre los distintos puntos de la cinética de crecimiento, se pueden observar ciertas diferencias entre los virus estudiados; estas diferencias, aun siendo estadísticamente significativas, no representan ningún impedimento para la capacidad replicativa *in vitro* de los virus analizados.

Atendiendo a los resultados obtenidos en la línea celular primaria CEF, se observa que el virus WR- Δ 3-Luc presenta el título más alto a las 48 hpi, manteniéndose a las 72 hpi mientras que el resto de los virus analizados continúan con la progresión de crecimiento (**Figura 14.A**). En la línea celular inmortalizada BSC40, en la que se observan los títulos más altos, los virus WR- Δ 3-Luc y WR- Δ 3- Δ C16L muestran los títulos virales más bajos a las 48 y 72 hpi en comparación con el resto de virus (**Figura 14.B**). En el caso de la línea murina tumoral de próstata TRAMP-C1 se presentan unos títulos virales promedio similares a los observados en la línea primaria CEF, observándose que los virus WR- Δ 3-Luc y WR- Δ 3- Δ F1L alcanzan sus valores de título máximos a las 48 hpi por encima del resto de los virus, y que a las 72 hpi el título alcanzado por el virus WR- Δ 3 es superior a los demás (**Figura 14.D**).

En la línea tumoral de melanoma B16F10 (**Figura 14.C**) los virus generados presentan un comportamiento general en las distribuciones de los títulos virales distinto al observado en el resto de las líneas celulares analizadas. Los virus WR- Δ 3 y WR- Δ 3-Luc presentan los mayores títulos virales a las 24 y 32 hpi, y el virus WR- Δ 3 un título por encima del resto de los virus a las 48 hpi. En el punto de las 72 hpi, todos los virus muestran un descenso en el título viral.

Los resultados obtenidos parecen indicar que los virus mutantes de delección generados, atendiendo al perfil de replicación a lo largo de la infección, se comportan de forma similar al virus parental salvaje WR en todas las líneas celulares empleadas, salvando diferencias puntuales. Asimismo, se puede observar que todos los virus presentan un

crecimiento más rápido en la línea de melanoma B16F10 (o una replicación más agresiva) para luego caer a tiempos tardíos (72 hpi). Igualmente, se puede apreciar un perfil de título del virus WR- Δ 3-Luc ligeramente menor en las líneas celulares analizadas frente al resto de los virus a las 72 hpi (excepto en la línea tumoral B16F10).

4.3. Análisis de la producción de proteína viral y la inducción de apoptosis en los diferentes virus mutantes de delección y/o recombinantes generados.

Para continuar con la caracterización de los vectores virales, se analizó si en células HeLa infectadas la cantidad de proteína viral se veía afectada, lo que podría indicar que alguna de las delecciones estuviera afectando alguna de las fases del ciclo de replicación del virus. Así, tal y como se puede observar en la **Figura 15.A**, todos los virus muestran un patrón de expresión de proteínas muy similar al observado en el virus parental WR, indicando que la traducción de proteínas virales no se ha visto afectada por ninguna de las delecciones o inserciones.

A continuación, se analizó la capacidad de los virus de inducir apoptosis, ya que una de las características del virus vaccinia es su capacidad para inhibir la apoptosis a nivel mitocondrial mediante de la proteína F1 (Wasilenko *et al.*, 2003) que actúa como inhibidor de la caspasa 9 y del punto de control Bak/Bax. Así, y teniendo en cuenta que el diseño de los virus está orientado a promover la lisis de las células tumorales, se han analizado los niveles de PARP y el fragmento cortado de PARP (cPARP) en las células HeLa y B16F10 para determinar la capacidad de inducir apoptosis de los diferentes mutantes de delección. En la línea celular HeLa se puede observar como el virus salvaje WR inhibe la apoptosis en células infectadas sin observarse PARP cortado, al igual que ocurre en los virus recombinantes WR- Δ 3, WR- Δ 3-Luc y WR- Δ 3- Δ C16L; sin embargo, en las células infectadas con el virus WR- Δ 3- Δ F1L se observa una intensidad de banda de PARP cortado similar a la obtenida para el control positivo de apoptosis inducida por estaurosporina (**Figura 15.B**). Del mismo modo, al analizar los valores de intensidad se observa un aumento significativo de cPARP en las células infectadas con WR- Δ 3- Δ F1L en comparación con el resto de virus.

En la línea celular B16F10 se observan niveles variables de cPARP, con un nivel alto en el virus parental salvaje WR y el mayor nivel en el virus mutante WR- Δ 3- Δ F1L

(mostrando los niveles de cPARP más altos y los niveles más bajos de PARP) (**Figura 15.C**), al igual que ocurría en las células HeLa.

En resumen, los resultados obtenidos indican que las deleciones no afectan de forma significativa al ciclo de infección viral, según se puede extraer de los datos de proteína viral total de células HeLa infectadas. Asimismo, en lo que respecta a la capacidad de los vectores para activar apoptosis, el mutante de deleción WR- Δ 3- Δ F1L presenta diferencias significativas en los niveles de cPARP en células HeLa; los datos obtenidos con el mutante de deleción del gen *FIL* muestran una capacidad superior para activar apoptosis en células infectadas, lo que indirectamente confirma la correcta deleción del gen dada la naturaleza inhibitoria de la apoptosis de la proteína viral F1. En el caso de los resultados obtenidos para la línea celular B16F10, la diferencia en los niveles de cPARP detectados es menos pronunciada cuando se comparan las muestras de WR- Δ 3- Δ F1L con el resto de los virus, sugiriendo que la apoptosis inducida por el virus en las células B16F10 no presenta el mismo comportamiento que en las células HeLa.

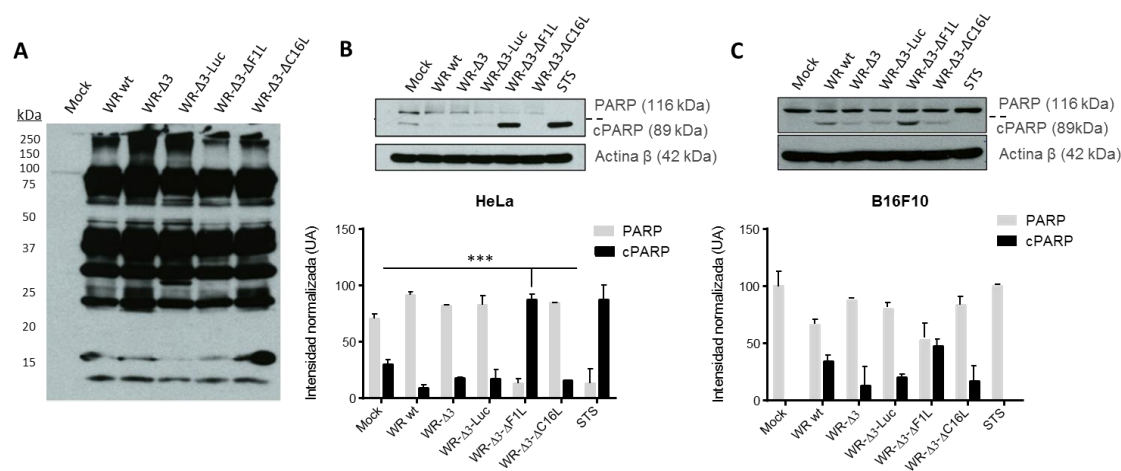


Figura 15. Caracterización *in vitro* de los virus recombinantes a nivel de expresión de proteína viral total y activación de apoptosis. A) Western blot de células HeLa infectadas con los distintos virus recombinantes, recogidas a las 16 hpi, e incubadas con un anticuerpo policlonal frente a WR (30 μ g de proteína por muestra). B, C) Células HeLa (B) o B16F10 (C) infectadas con los virus recombinantes y recogidas a las 18 hpi. En los paneles superiores se muestra un western blot frente a PARP (116 kDa) y cPARP (89 kDa) (30 μ g/muestra), y en los paneles inferiores se muestran los niveles de intensidad obtenidos (expresados en unidades arbitrarias) empleando ImageJ y

normalizados con los valores de actina β de cada muestra. Para el control con estaurosporina (STS), se incubaron las células con STS a una concentración de 1 μM durante 6 horas. En las gráficas se representa la media de los valores y la desviación estándar. Resultados representativos de 3 experimentos diferentes. Análisis estadístico aplicado: ANOVA: ***, $p < 0,005$.

4.4. Capacidad infectiva de los virus en el modelo *ex vivo* de esferoides de células tumorales TRAMP-C1.

Otro de los experimentos que se decidió realizar, previamente al estudio *in vivo* de la eficacia y comportamiento de los virus, estaba dirigido al análisis de la capacidad de la cepa WR y del virus mutante de delección WR- $\Delta 3$ -GFP (que presenta las mismas cuatro delecciones que el virus WR- $\Delta 3$ -Luc) de infectar y replicar en un modelo de esferoides tumorales en cultivo que asemeje las condiciones a nivel metabólico y estructural de un tumor trasplantado *in vivo*. En este caso, se decidió emplear células tumorales de próstata TRAMP-C1, dada la incapacidad de las células tumorales de melanoma B16F10 de formar esferoides siguiendo el protocolo descrito en el presente trabajo. Para ello, se cultivaron los esferoides tal y como se describe en el apartado 3.3.5. de materiales y métodos, se infectaron a una multiplicidad de infección de 1 ufp/célula, y se fue monitorizando el aspecto y tamaño de los esferoides diariamente hasta el día 6 post-infección cuando se fijaron y se llevaron a cabo los cortes y la tinción de las diferentes secciones.

En las imágenes tomadas con el microscopio en campo claro (**Figura 16 – Paneles izquierdos**) se puede observar que los esferoides infectados presentan una capa superficial más refringente en comparación con el esferoide no infectado, haciéndose patente el efecto citopático en las células infectadas más expuestas a los virus. Este efecto se puede apreciar con mayor claridad cuando se analizan las imágenes obtenidas tras la fijación y corte de los esferoides; así tras la tinción con hematoxilina/eosina (**Figura 16 – Paneles centrales**) se puede observar que en las secciones de las muestras infectadas, los esferoides aparecen más disgregados en comparación con la apariencia compacta y definida del esferoide no infectado. Asimismo, se puede observar que la infección de los esferoides se distribuye por toda la superficie del esferoide infectado por el virus WR- $\Delta 3$ -GFP (**Figura 16 – Paneles derechos**).

Los resultados obtenidos muestran que en los esferoides de células TRAMP-C1 la infección y replicación virales tienen lugar de forma exitosa, observándose en las muestras infectadas unos esferoides desestructurados en las regiones más expuestas a la infección, a diferencia de lo observado en los esferoides no infectados que muestran la capa externa intacta.

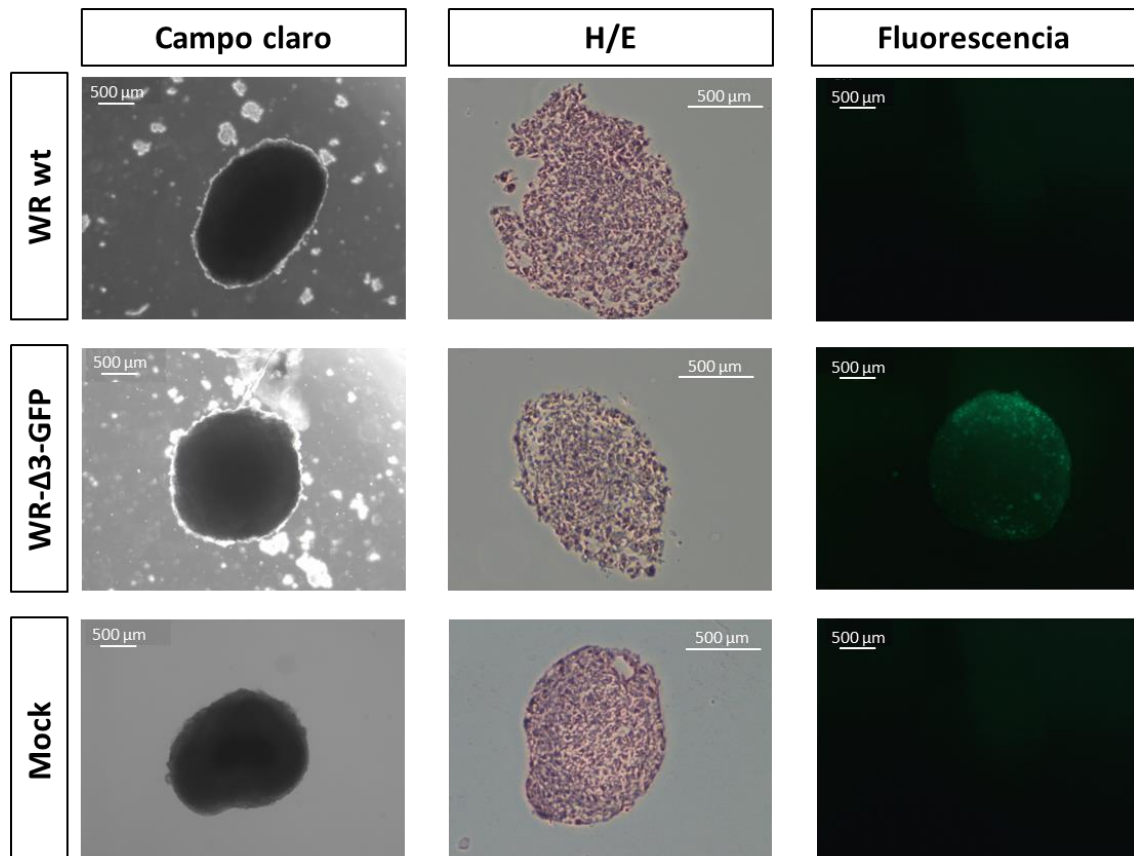


Figura 16. **Comportamiento de los virus WR y WR-Δ3-GFP en la infección de esferoides de TRAMP-C1.** Las imágenes mostradas corresponden a micrografías en campo claro de esferoides en cultivo (paneles izquierdos), micrografías de secciones de esferoides teñidos con hematoxilina/eosina (paneles centrales), y micrografías con un filtro de fluorescencia de esferoides en cultivo (paneles derechos). Las imágenes son representativas de 6 repeticiones realizadas por condición.

4.5. Evaluación de la seguridad *in vivo* de los virus mutantes de delección.

Uno de los factores críticos a tener en cuenta a la hora de diseñar un candidato vacunal para su uso terapéutico es la seguridad del vector *in vivo*; de hecho esta seguridad adquiere especial importancia en el presente trabajo dado que los virus que se van a emplear replican normalmente en células de mamíferos, por lo que las delecciones llevadas a cabo sobre dichos virus tienen como objetivo restringir al máximo dicha replicación a un contexto tumoral y minimizar el impacto sobre tejido somático.

Para caracterizar la seguridad de los distintos vectores virales generados, se ha utilizado un protocolo de inoculación intranasal empleando distintas dosis de virus (5×10^6 y 5×10^7 ufp/ratón) y el posterior seguimiento de los síntomas de enfermedad y pérdida de peso que muestren los ratones. Para evaluar el grado de severidad de la infección en los animales inmunizados, se ha tenido en cuenta: 1) el estado general de los animales, incluyendo parámetros como: la movilidad, el acicalamiento y la correcta respiración (la evaluación se llevó a cabo dando un valor de “1” al estado normal de los animales hasta un valor máximo de “4” como estado de mayor severidad de los síntomas); y 2) la pérdida de peso. Como criterios de punto final se estableció una pérdida del 25% o bien una vez que los ratones hubieron alcanzado el grado más severo (valor de 4) en cualquiera de los parámetros analizados.

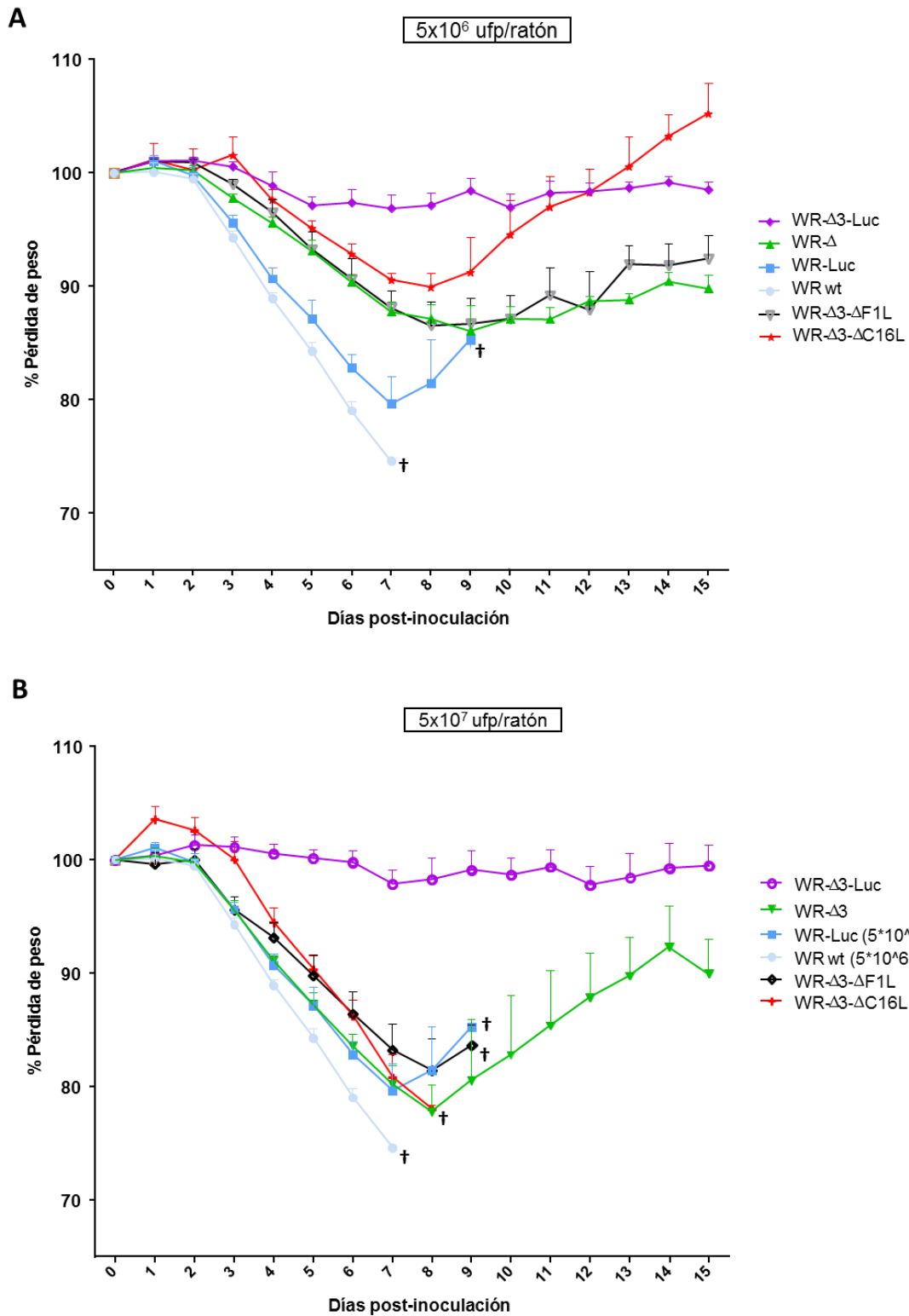


Figura 17. **Ensayo de supervivencia para evaluar la seguridad de los virus mutantes de delección.** Seguimiento de los pesos de ratones inmunizados con 5×10^6 ufp/ratón (A) o 5×10^7 ufp/ratón (B) de los vectores virales candidatos. Se muestra el promedio de los valores de pérdida de peso de los animales de cada grupo. Los ratones fueron

inoculados por vía intranasal y se les hizo un seguimiento diario de peso corporal y de síntomas de enfermedad. La pérdida de peso se representa en proporción al peso inicial individual que los ratones presentaban a día 0, previamente a la administración del virus. Para el ensayo se utilizaron 6 animales por grupo. En las gráficas se representa la media de los valores y el error estándar de la media. El símbolo “†” indica que al final del experimento, todos los animales de ese grupo tuvieron que ser sacrificados.

Atendiendo a los resultados obtenidos con la menor dosis de virus (5×10^6 ufp/ratón; **Figura 17.A**) el grupo control inoculado con 5×10^6 ufp/ratón del virus parental salvaje WR, muestra un descenso progresivo de peso y se observa cómo los signos de enfermedad evaluados empeoraban hasta 7 días después de la inoculación donde se sacrificó el último ratón de su grupo (**Figura 18.A**). Un perfil muy similar se observa en los ratones inoculados con el virus WR-Luc (al que se deletó el gen *J2R* para insertar el gen de la luciferasa en su lugar). En el caso de los ratones inmunizados con los virus WR- $\Delta 3$ o WR- $\Delta 3$ - $\Delta F1L$, éstos disminuyen su peso hasta el día 7 post-inoculación, manteniendo dicho peso hasta el fin del ensayo y mostrando también una recuperación completa en cuanto a los síntomas de enfermedad observados (**Figura 18.A**); con estos dos virus se obtuvo un porcentaje de supervivencia del 83%, debido a la muerte de 1 ratón de cada grupo los días 9 y 8, respectivamente. En el caso de los ratones inmunizados con WR- $\Delta 3$ - $\Delta C16L$ se aprecia una disminución de peso corporal hasta el día 8 y un grado medio de síntomas de enfermedad, tras lo cual los animales se recuperan completamente mostrando un 100% de supervivencia (**Figura 18.A**). El grupo de ratones inoculados con el virus WR- $\Delta 3$ -Luc muestra un leve descenso del peso corporal, que mantiene hasta el final del experimento; en este caso los animales no mostraron ningún síntoma de enfermedad y se mantuvieron en el mismo estado que presentaban antes de la inoculación del virus (mostraron una supervivencia del 100%) (**Figura 18.A**).

Con la dosis superior de virus (5×10^7 ufp/ratón; **Figura 17.B**), el grupo del virus WR- $\Delta 3$ muestra un descenso global del peso de los animales hasta el día 8 post-inoculación, punto en el que se tuvieron que sacrificar 3 ratones debido a su pérdida de peso del 25% y a la gravedad de los problemas respiratorios que presentaban; los otros 3 animales se recuperaron por completo de forma progresiva (**Figura 18.B**). Los animales inoculados con los virus WR- $\Delta 3$ - $\Delta F1L$ o WR- $\Delta 3$ - $\Delta C16L$ mostraron el mismo comportamiento que los animales inmunizados con el virus salvaje WR a la dosis más baja, observándose

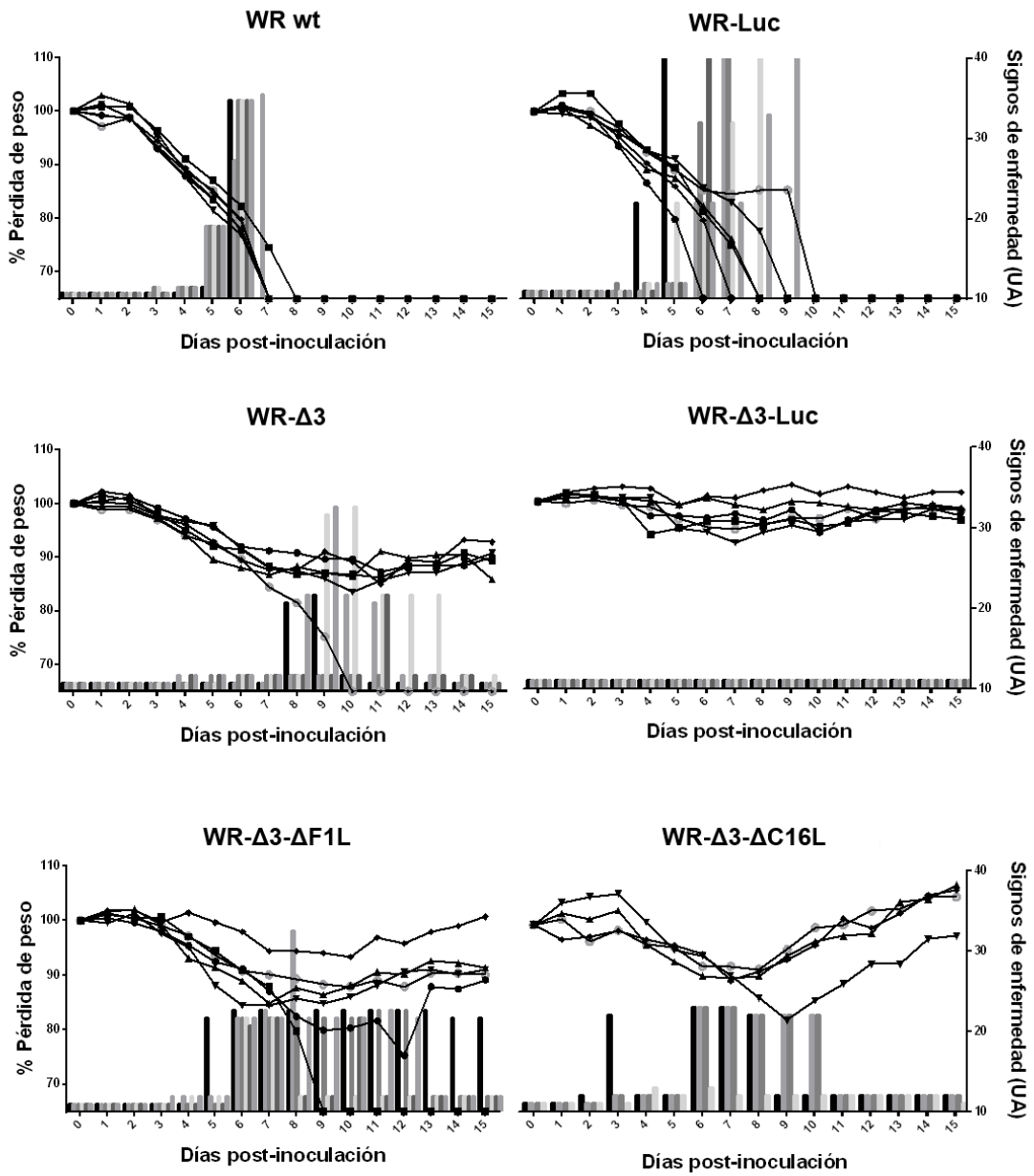
una pérdida de peso dramática en los 8 días siguientes a la inoculación de los virus y unos síntomas severos de enfermedad que llevaron al sacrificio de todos los animales por haber alcanzado los criterios de punto final (**Figura 18.B**). Por último, los animales inoculados con el virus WR- Δ 3-Luc no mostraron ningún efecto derivado de la infección, de forma que mantuvieron estable el peso corporal y no llegó a apreciarse en el transcurso del experimento que los animales mostrasen problemas de movilidad, ausencia de acicalamiento o problemas respiratorios, presentando un 100% de supervivencia (**Figura 18.B**).

Tal y como se ha podido observar, cuando se emplea una dosis de 5×10^6 ufp/ratón (dosis letal para los virus control WR y WR-Luc) las deleciones efectuadas sobre los virus les proporcionan un incremento en su seguridad, que se manifiestan en un descenso transitorio en el peso de los animales y signos de enfermedad moderados en los grupos inmunizados con WR- Δ 3, WR- Δ 3- Δ F1L (supervivencias del 83%) o WR- Δ 3- Δ C16L (supervivencia del 100%); y mostrando que el virus mutante de deleción WR- Δ 3-Luc no causa enfermedad en los ratones. Es interesante remarcar que la sola deleción del gen *J2R* sobre el genoma de WR- Δ 3 mejora considerablemente su seguridad, aunque la deleción de este gen no sea suficiente por sí sola, tal y como muestran los resultados de los animales tratados con WR-Luc.

Cuando se utiliza una dosis de 5×10^7 ufp/ratón (**Figura 17.B**), ésta resulta letal para los animales inmunizados con los virus WR- Δ 3- Δ F1L o WR- Δ 3- Δ C16L, y se establece como la dosis letal 50 para el virus WR- Δ 3. En cuanto a los animales inmunizados con WR- Δ 3-Luc, se puede observar que los ratones no muestran síntomas de enfermedad ni experimentan pérdida de peso como consecuencia de la infección, indicando un alto grado de seguridad.

Dosis: 5×10^6 ufp/ratón

A



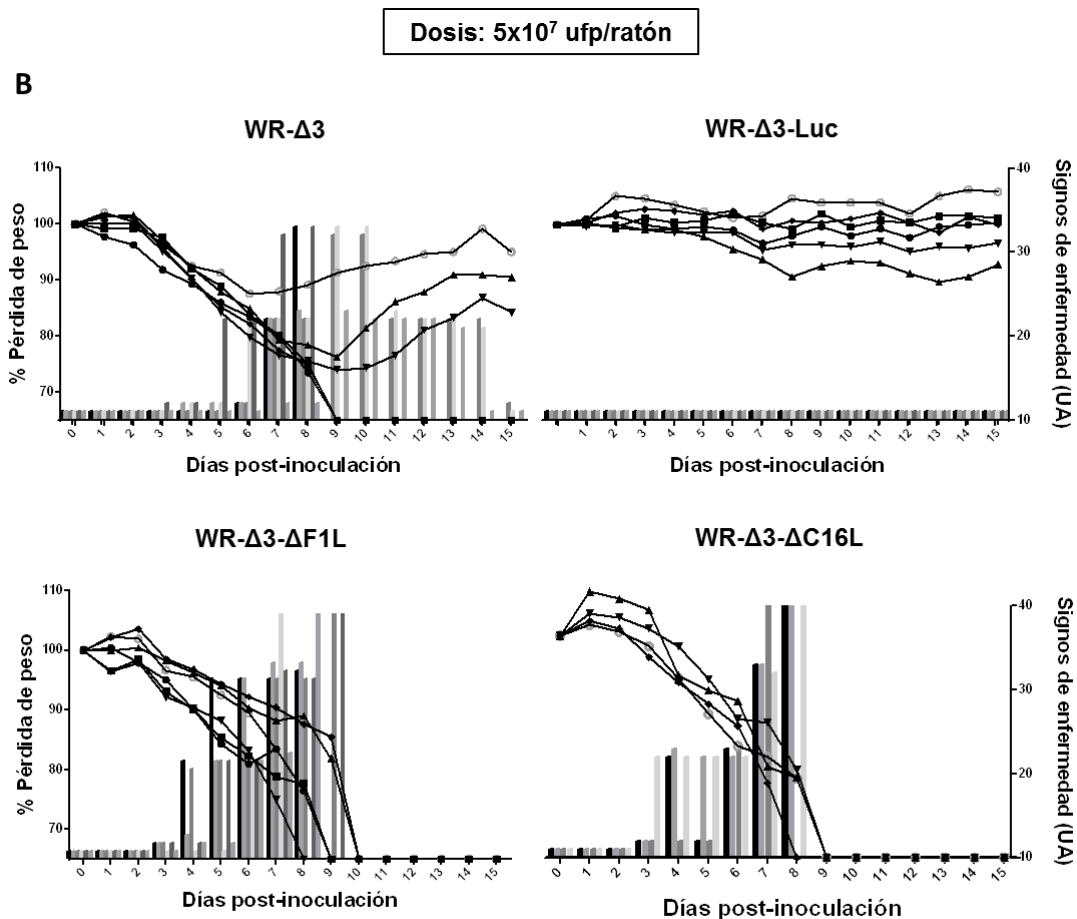


Figura 18. Evolución individual de la pérdida de peso y los signos de enfermedad en el estudio de supervivencia. Se muestran los valores individuales de cada ratón en los distintos grupos de la pérdida de peso (representado como una línea continua con las unidades en el eje de la izquierda) y de los signos de enfermedad (representados como columnas con las unidades en el eje derecho de las gráficas), a dosis de 5×10^6 ufp/ratón (A) o 5×10^7 ufp/ratón (B). Los ratones fueron inoculados por vía intranasal y se les hizo un seguimiento diario de peso corporal y síntomas de enfermedad. La pérdida de peso se representa en proporción al peso inicial individual que los ratones presentaban a día 0, previamente a la administración del virus. Los signos de enfermedad se representan con unidades arbitrarias y el método de evaluación se basa en un número de 2 cifras, donde la primera cifra corresponde a los signos generales de enfermedad (incluyendo movilidad, acicalamiento y aspecto general) y la segunda corresponde a los problemas respiratorios que puedan experimentar los ratones; los síntomas se evaluaron dando un “1” a la ausencia de síntomas hasta un “4” como grado severo de la afección por la infección del virus. Se consideró criterio de punto final cuando se registraba una pérdida

de peso del 25% o cuando un animal alcanzaba un valor de 4 en cualquiera de los dos signos de enfermedad evaluados.

4.6. Análisis de la capacidad replicativa de los virus *in vivo*.

Para continuar con la caracterización de los distintos virus mutantes de delección generados, se llevó a cabo un estudio de biodistribución para analizar la capacidad replicativa de los virus en aquellos órganos donde la infección con la cepa WR del virus vaccinia presenta un alto impacto, y a continuar caracterizando la seguridad *in vivo*.

Para ello, se administró a los ratones una dosis de 2×10^7 ufp/ratón de cada uno de los virus por vía intraperitoneal; a las 24, 72 y 120 horas tras la administración del inóculo se sacrificaron 3 animales por grupo, se realizaron lavados peritoneales y se extrajeron los ovarios y el cerebro. Las muestras se procesaron y se determinaron los títulos virales y la cantidad de proteína total en cada muestra (los valores de títulos virales se corrigieron por los miligramos de proteína total en cada órgano).

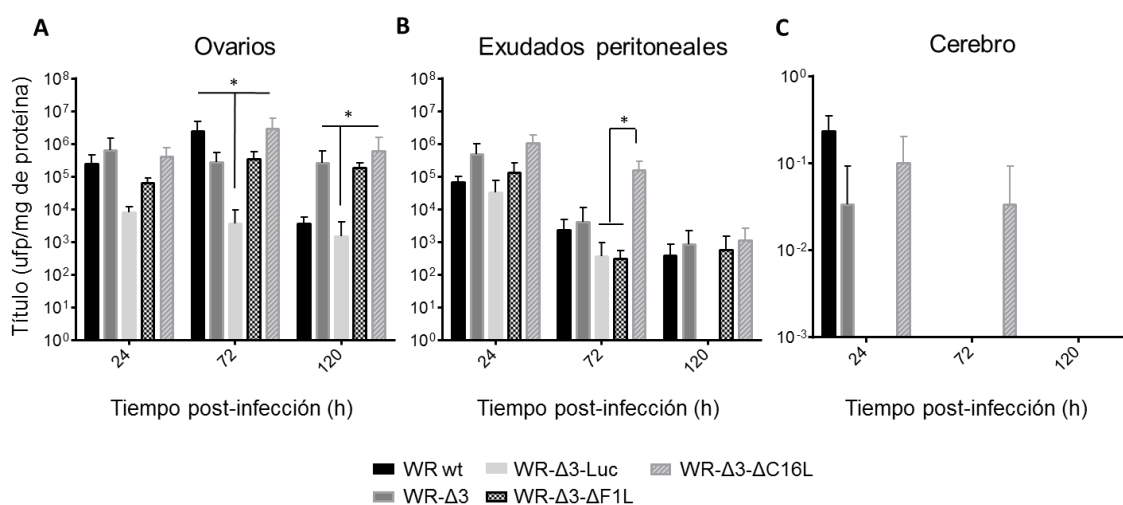


Figura 19. **Capacidad replicativa de los virus recombinantes en ratón.** Títulos virales obtenidos a 24, 72 y 120 horas tras inoculación por vía i.p. analizados en ovarios (A), exudados peritoneales (B) y cerebro (C). Se representa el valor promedio de los títulos virales obtenidos de 3 ratones (corregidos por los miligramos de proteína totales obtenidos en cada órgano y punto de tiempo). En las gráficas se representa la media de los valores y la desviación estándar. La comparación entre grupos se llevó a cabo mediante un test ANOVA: *, $p < 0,05$.

Tal y como se puede observar en los datos obtenidos en ovarios (**Figura 19.A**), los virus WR- $\Delta 3$, WR- $\Delta 3$ - $\Delta F1L$ y WR- $\Delta 3$ - $\Delta C16L$ muestran un perfil muy similar al observado en los animales infectados con WR salvaje, de forma que hay un incremento en el título desde el punto de las 24 hpi a las 72 hpi debido a la replicación viral (manteniéndose en el caso del virus WR- $\Delta 3$); sin embargo, los títulos se mantienen entre las 72 y 120 hpi, estando estos títulos por encima del observado en los animales infectados con WR salvaje a las 120 hpi. Por el contrario, el virus WR- $\Delta 3$ -Luc muestra una capacidad de replicación reducida *in vivo* dado que no se observa un incremento en el título viral a las 72 horas ($p < 0,05$), sino una disminución gradual con el tiempo. También se puede apreciar que los títulos obtenidos en los ratones infectados con el virus WR- $\Delta 3$ -Luc son más bajos que para el resto de los virus estudiados.

Cuando se analizan los títulos virales en las células de los exudados peritoneales (**Figura 19.B**), se puede observar que todos los grupos muestran a las 24 hpi un título viral similar al obtenido en ovarios en el mismo punto de tiempo. El perfil de los títulos virales obtenidos para los virus recombinantes y para el virus salvaje WR es similar (partiendo de títulos de 10^5 - 10^6 ufp/mg a las 24 hpi hasta llegar a títulos de 10^2 - 10^3 ufp/mg a las 120 hpi), pudiéndose apreciar que los animales infectados con WR- $\Delta 3$ - $\Delta C16L$ muestran una menor disminución del título en las células del peritoneo a las 72 hpi, que termina igualándose al resto de los grupos a las 120 hpi. De nuevo, son destacables los resultados obtenidos para el grupo infectado con WR- $\Delta 3$ -Luc donde se puede observar que, aun manteniendo un comportamiento similar al resto de los virus a las 24 y 72 hpi, a las 120 hpi no se puede detectar virus en los exudados peritoneales de ninguno de los animales infectados.

Dado el amplio tropismo del virus vaccinia, la posibilidad de que los vectores candidatos puedan infectar el cerebro constituye un alto riesgo en caso de que se decida emplear una ruta de inoculación sistémica. Por este motivo se analizaron los títulos en cerebro de los ratones infectados (**Figura 19.C**) y tal y como se puede observar los títulos obtenidos son muy bajos (siendo el título más alto de 0,4 ufp/mg). Además, únicamente fueron detectables a las 24 hpi en los grupos infectados con WR salvaje y WR- $\Delta 3$, y a las 24 y 72 hpi en los animales infectados con el virus WR- $\Delta 3$ - $\Delta C16L$.

En conjunto, los resultados obtenidos indican que los virus recombinantes WR- $\Delta 3$, WR- $\Delta 3$ - $\Delta F1L$ y WR- $\Delta 3$ - $\Delta C16L$ se comportan como el virus parental WR, aunque

mostrando títulos virales más altos en ovarios a las 120 hpi. En cuanto a los datos obtenidos en cerebro, los títulos encontrados son despreciables, pero se ha de tener en cuenta que en un paciente inmunodeprimido y tratándose de virus replicativos estos pueden suponer un riesgo. Así mismo, es muy destacable el comportamiento que se ha observado en los ratones infectados con el virus WR- Δ 3-Luc, mostrando los títulos más bajos en todos los tiempos y órganos analizados, llegando a no ser detectada la infección en las muestras de exudados peritoneales a las 120 hpi ni en las muestras de cerebro en ninguno de los tiempos estudiados. Esto muestra que en animales sanos y tejidos somáticos el conjunto de deleciones e inserciones llevadas a cabo en WR- Δ 3-Luc le otorgan unas características óptimas en lo que se refiere a la seguridad del vector en un contexto no-tumoral, y a su posible uso en administraciones sistémicas.

4.7. Efecto de las deleciones sobre la migración de poblaciones de respuesta innata en ratones infectados.

A continuación se caracterizó el perfil de migración de los distintos tipos celulares involucrados en la respuesta temprana frente a los virus candidatos; para así determinar si las poblaciones celulares que migran (desde o hasta) el sitio de infección se ven afectadas por las deleciones llevadas a cabo en los virus recombinantes y si el cambio o mantenimiento de dicho perfil de migración está asociado a tipos celulares potencialmente beneficiosos en un contexto tumoral.

Para llevar a cabo el experimento, se inoculó a los ratones una dosis de 1×10^7 ufp/ratón por vía i.p. y se analizaron las distintas poblaciones celulares en los exudados peritoneales de los animales a las 3, 6 y 12 hpi (según el protocolo descrito en el apartado 3.3.4.2.1. de materiales y métodos).

4.7.1. Análisis de poblaciones celulares en exudados peritoneales a las 3 hpi.

De los resultados obtenidos 3 horas después de la inoculación de los virus (**Figura 20**), se puede observar que el número de monocitos, células dendríticas, células NK, células NKT, linfocitos T CD4, linfocitos T CD8 y linfocitos B se mantienen al nivel, o ligeramente por debajo, de las células presentes en el peritoneo de animales inyectados con PBS, siendo los animales inoculados con el virus WR- Δ 3- Δ F1L los únicos que muestran un número de células ligeramente superior al resto de los grupos. En lo referente a los macrófagos, se observa una disminución temprana en el número de células en el peritoneo en todos los grupos tratados con virus, siendo ésta disminución una característica tras una inoculación intraperitoneal con virus replicativos, y siendo los macrófagos las células del sistema inmune más abundantes en el peritoneo y a las que mayoritariamente afecta la infección primaria del virus vaccinia. Cuando se analizan los neutrófilos, se puede observar que todos los virus, exceptuando el recombinante WR- Δ 3- Δ C16L, presentan valores superiores al grupo PBS; además, se observa que los ratones inoculados con el virus WR- Δ 3-Luc presentan un número de neutrófilos significativamente superior a los inoculados con el virus salvaje WR.

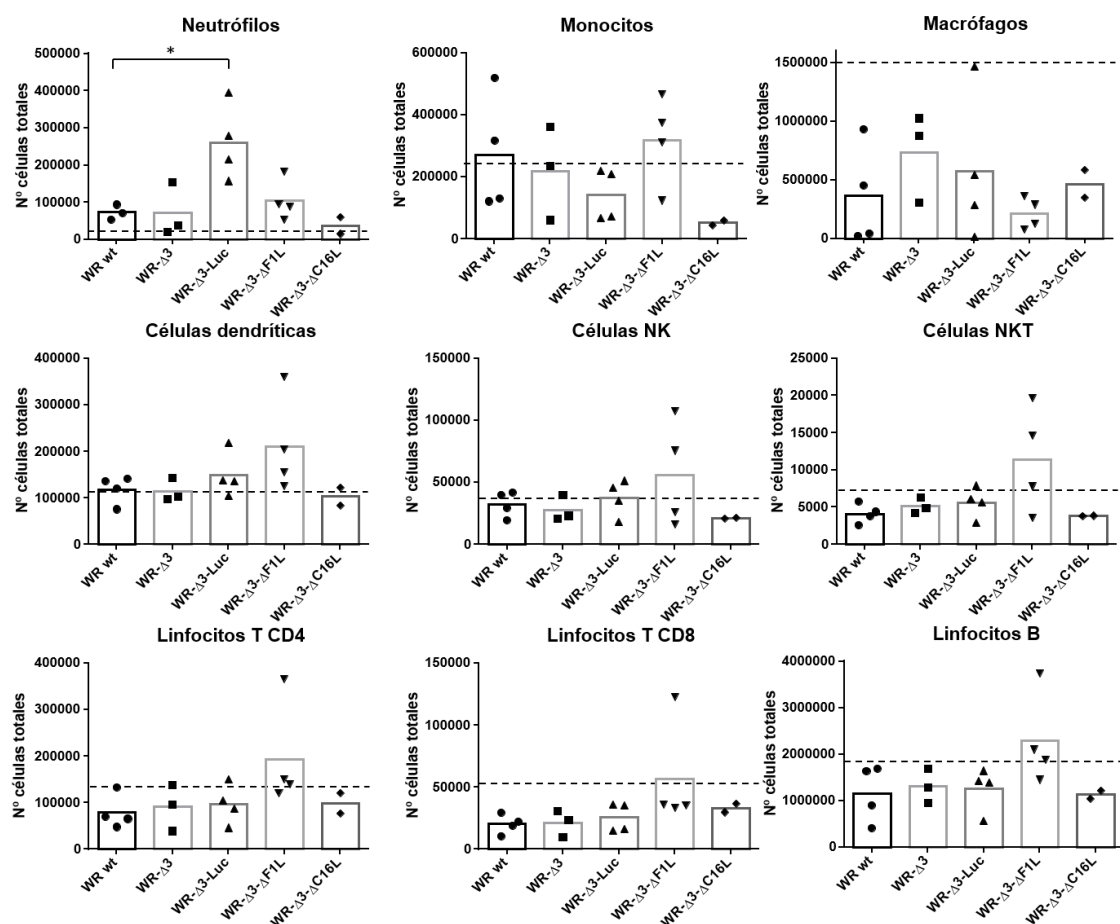


Figura 20. **Análisis de migración de poblaciones celulares de respuesta innata en exudados peritoneales a las 3 hpi.** Los animales se sacrificaron 3 horas después de inyectar los inóculos de virus, se realizaron los lavados peritoneales y se analizaron las siguientes poblaciones celulares expresadas como número de células totales: Neutrófilos, Monocitos, Macrófagos, Células dendríticas, Células NK, Células NKT, Linfocitos T CD4, Linfocitos T CD8, y Linfocitos B. La línea discontinua representa el valor medio obtenido en animales tratados con PBS. Para el análisis estadístico se ha empleado un test ANOVA: *, $p < 0,05$.

4.7.2. Análisis de poblaciones celulares en exudados peritoneales a las 6 hpi.

Respecto a los resultados obtenidos de la migración de las poblaciones celulares a las 6 horas post-infección, los valores generales para todas las poblaciones excepto para los macrófagos se sitúan por encima de los obtenidos en el grupo de los inyectados con PBS, presentando además números totales de células superiores a lo observado a 3 hpi (**Figura 20**). Así, en el punto de 6 hpi (**Figura 21**), el número de neutrófilos que migran a la cavidad peritoneal es significativamente superior en todos los grupos tratados con

virus en comparación con el grupo PBS, y los animales tratados con los virus WR- Δ 3, WR- Δ 3-Luc y WR- Δ 3- Δ C16L presentan un aumento significativo en la migración de neutrófilos con respecto al grupo de WR wt. Atendiendo a los monocitos, las células NK, los linfocitos T CD4, los linfocitos T CD8 y los linfocitos B se observa el mismo perfil de migración entre los grupos, de forma que los ratones inoculados con WR wt, WR- Δ 3 y WR- Δ 3-Luc presentan los valores más altos situándose por encima de los obtenidos en el grupo PBS y en los grupos de los mutantes de delección para *FIL* y *C16L* (**Figura 21**). Tras el análisis de los macrófagos se puede apreciar que a las 6 hpi el número de células en los ratones inyectados con los diferentes virus vaccinia se encuentra muy por debajo de los valores obtenidos en el grupo PBS, situándose los valores de WR- Δ 3-Luc y WR- Δ 3- Δ F1L significativamente por debajo de los valores observados en el grupo WR wt. Los valores obtenidos para células dendríticas y células NKT se encuentran próximos a los observados en los animales tratados con PBS, sin encontrar diferencias significativas.

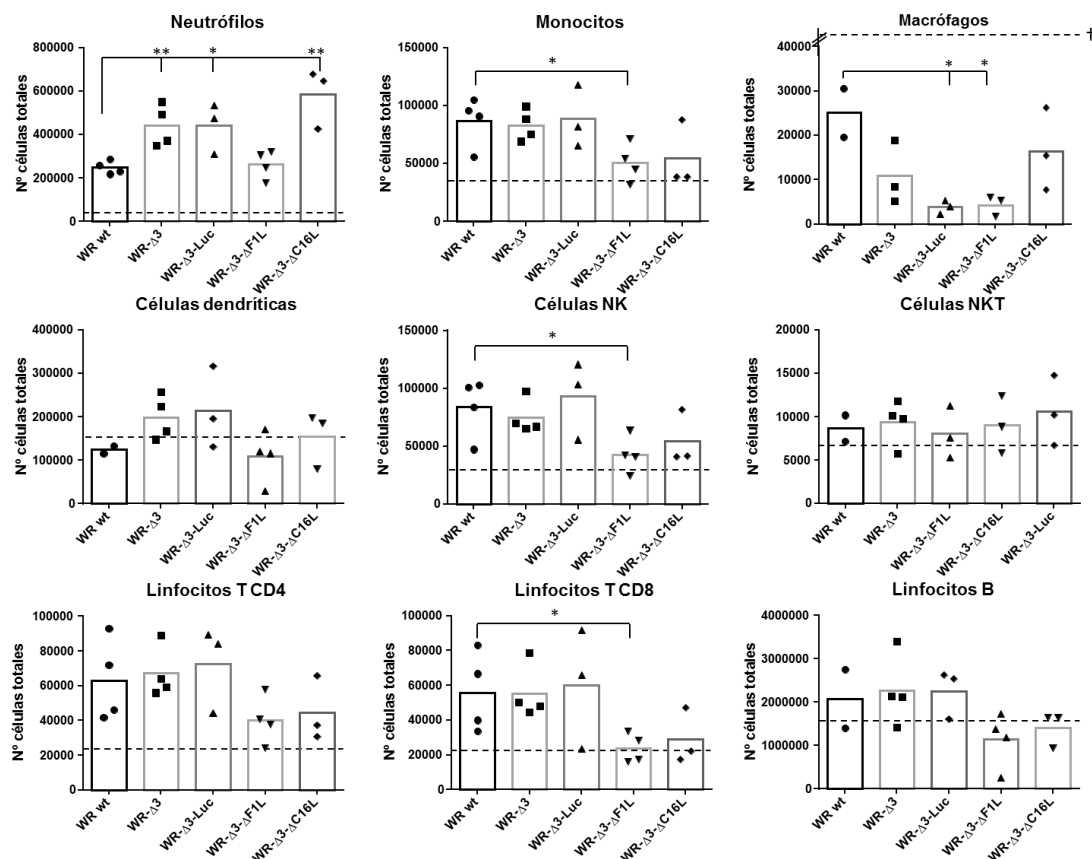


Figura 21. Análisis de migración de poblaciones celulares de respuesta innata en exudados peritoneales a las 6 hpi. Los animales se sacrificaron 6 horas después de

inyectar los inóculos de virus, se realizaron los lavados peritoneales y se analizaron las siguientes poblaciones celulares expresadas como número de células totales: Neutrófilos, Monocitos, Macrófagos, Células dendríticas, Células NK, Células NKT, Linfocitos T CD4, Linfocitos T CD8, y Linfocitos B. La línea discontinua representa el valor obtenido en animales tratados con PBS. “†” número medio de macrófagos en los animales inyectados con PBS: 775.046 células totales. Para el análisis estadístico se ha empleado un test ANOVA: *, $p < 0,05$; **, $p < 0,01$.

4.7.3. Análisis de poblaciones celulares en exudados peritoneales a 12 hpi.

Por último, en el punto de las 12 hpi (**Figura 22**), los valores obtenidos en los distintos tipos celulares entre los grupos de virus se igualaron minimizando las diferencias observadas a tiempos más tempranos. Así, los valores de neutrófilos continúan estando muy por encima de los obtenidos en animales inoculados con PBS ($p < 0,005$), siendo el grupo inmunizado con el virus WR- $\Delta 3$ -Luc el que presenta el valor medio más alto y el grupo inoculado con el mutante de delección para *FIL* el valor más bajo. En lo que se refiere a los valores obtenidos para los monocitos, los ratones inoculados con los distintos virus muestran valores similares, a excepción del mutante de delección WR- $\Delta 3$ - $\Delta F1L$ que muestra valores de monocitos a nivel de los observados en el grupo PBS, y del mutante WR- $\Delta 3$ - $\Delta C16L$ que muestra los valores medios más altos. Respecto al número de macrófagos detectados, aún a las 12 hpi los ratones infectados continúan mostrando niveles mucho más bajos que los detectados en el grupo PBS ($p > 0,005$), y a su vez los animales infectados con los mutantes de delección muestran valores significativamente más bajos que los infectados con el virus salvaje WR. Para el resto de los tipos celulares analizados (**Figura 22**) los valores obtenidos no muestran diferencias significativas entre los distintos grupos de virus; asimismo, los valores obtenidos en los distintos tipos celulares se sitúan por encima de los obtenidos en los animales inyectados con PBS, excepto para los linfocitos B donde la media de los valores en el grupo PBS está por encima del resto.

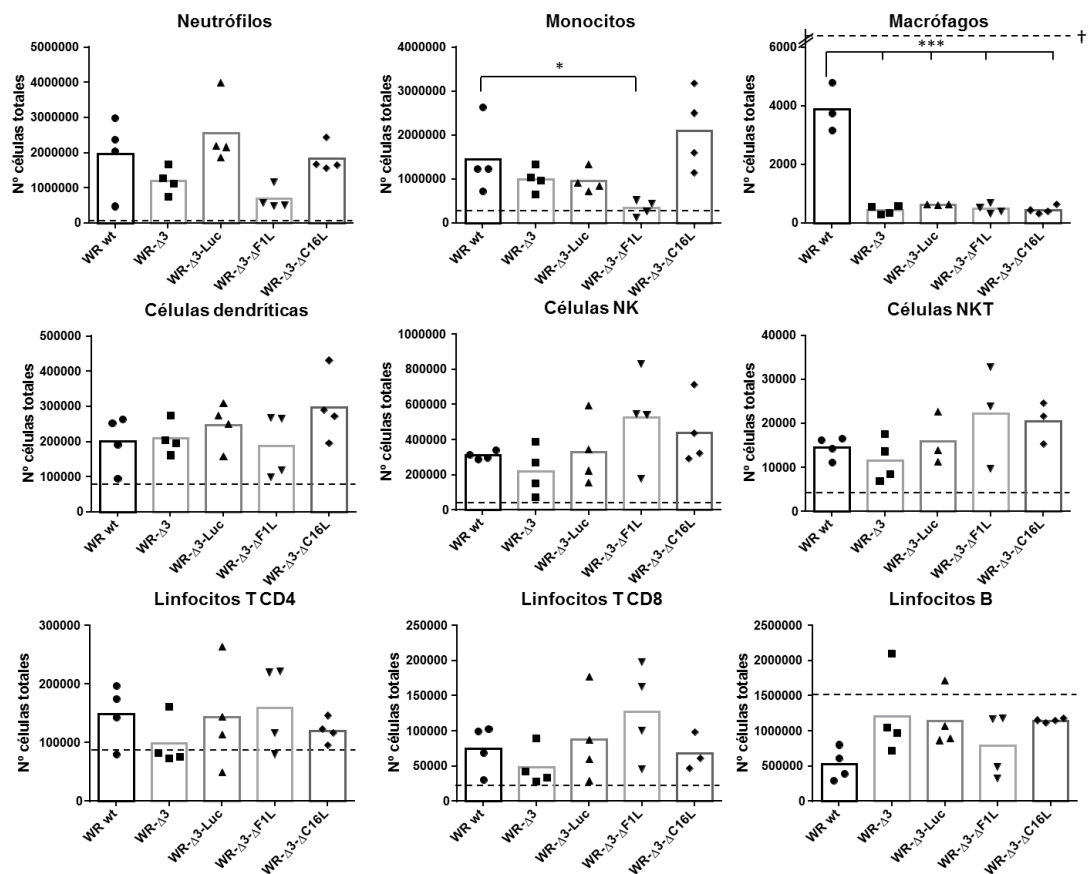


Figura 22. **Análisis de migración de poblaciones celulares de respuesta innata en exudados peritoneales a las 12 hpi.** Los animales se sacrificaron 12 horas después de inyectar los inóculos de virus, se realizaron los lavados peritoneales y se analizaron las siguientes poblaciones celulares expresadas como número de células totales: Neutrófilos, Monocitos, Macrófagos, Células dendríticas, Células NK, Células NKT, Linfocitos T CD4, Linfocitos T CD8, y Linfocitos B. La línea discontinua representa el valor obtenido en animales tratados con PBS. “†” número medio de macrófagos en los animales inyectados con PBS: 1.209.780 células totales. Para el análisis estadístico se ha empleado un test ANOVA: *, $p < 0,05$; ***, $p < 0,005$.

Así, en conjunto se puede observar que las deleciones llevadas a cabo en los vectores candidatos, destacando entre ellos el virus WR-Δ3-Luc, mejoran o mantienen los perfiles de migración obtenidos en ratones infectados con el virus salvaje WR; destacando especialmente el aumento en el número de neutrófilos reclutados, aunque observándose ciertas diferencias entre los distintos virus mutantes de deleción en la evolución de dichas migraciones a lo largo de los tres tiempos analizados. Asimismo, la sola infección por parte de la cepa WR del virus vaccinia muestra un aumento global

significativo respecto de los animales inoculados con PBS en todas las poblaciones celulares analizadas (exceptuando los macrófagos) a las 6 y 12 hpi.

4.8. Análisis del comportamiento de los virus recombinantes en el modelo singénico murino para la línea tumoral de melanoma B16F10.

Una vez caracterizados los diferentes mutantes de delección, se decidió analizar su eficacia *in vivo* empleando como modelo el trasplante singénico de células de melanoma B16F10 en ratones C57BL/6. Para ello se siguió la metodología descrita en el apartado 3.3.7.1. de materiales y métodos, de forma que una vez que los tumores alcanzaron un volumen de 40-50 mm³, se administró intratumoralmente una sola dosis de 1x10⁸ ufp/ratón de cada uno de los virus y se monitorizaron los ratones diariamente. Como criterio de punto final se estableció el punto en el que los tumores alcanzaron un volumen de 1400-1500 mm³ y el experimento se dio por finalizado a día 12, una vez que todos los ratones del grupo control (PBS) fueron sacrificados (**Figura 23.A**).

Tal y como se puede observar en la **Figura 23.B**, todos los ratones presentan un volumen de tumor al inicio del experimento muy similar entre grupos, lo que indica la correcta inoculación de las células tumorales y permite atribuir las diferencias observadas a lo largo del experimento a los distintos tratamientos administrados. El perfil de crecimiento tumoral normal que presentan los tumores tratados con PBS, se caracteriza por un aumento paulatino del volumen tumoral los 5 primeros días, para después mostrar un aumento pronunciado de la tasa de crecimiento tumoral hasta el final del experimento. Así, teniendo como referencia la evolución de los tumores trasplantados en ratones tratados con PBS, se puede apreciar que todos los animales que reciben la dosis de virus han sido capaces de controlar el crecimiento de los tumores en distintos grados, evidenciando la capacidad oncolítica que presenta *per se* el virus vaccinia. Se puede observar que los animales inoculados con WR wt y WR-Luc son los que presentan menor grado de reducción en la tasa de crecimiento tumoral (**Figura 23.B**); asimismo, se observa que para el resto de los grupos (WR-Δ3, WR-Δ3-Luc y WR-Δ3-ΔF1L), los valores promedios del volumen de los tumores muestran una evolución similar a lo largo del experimento, observándose un crecimiento más controlado del tamaño de los tumores (**Figura 23.B**). En lo que respecta al resto de los parámetros analizados en el experimento, no se observó ninguna alteración en la evolución del peso corporal o síntomas de enfermedad que correlacionasen con el

aumento del volumen tumoral en los ratones en ninguno de los grupos (datos no mostrados).

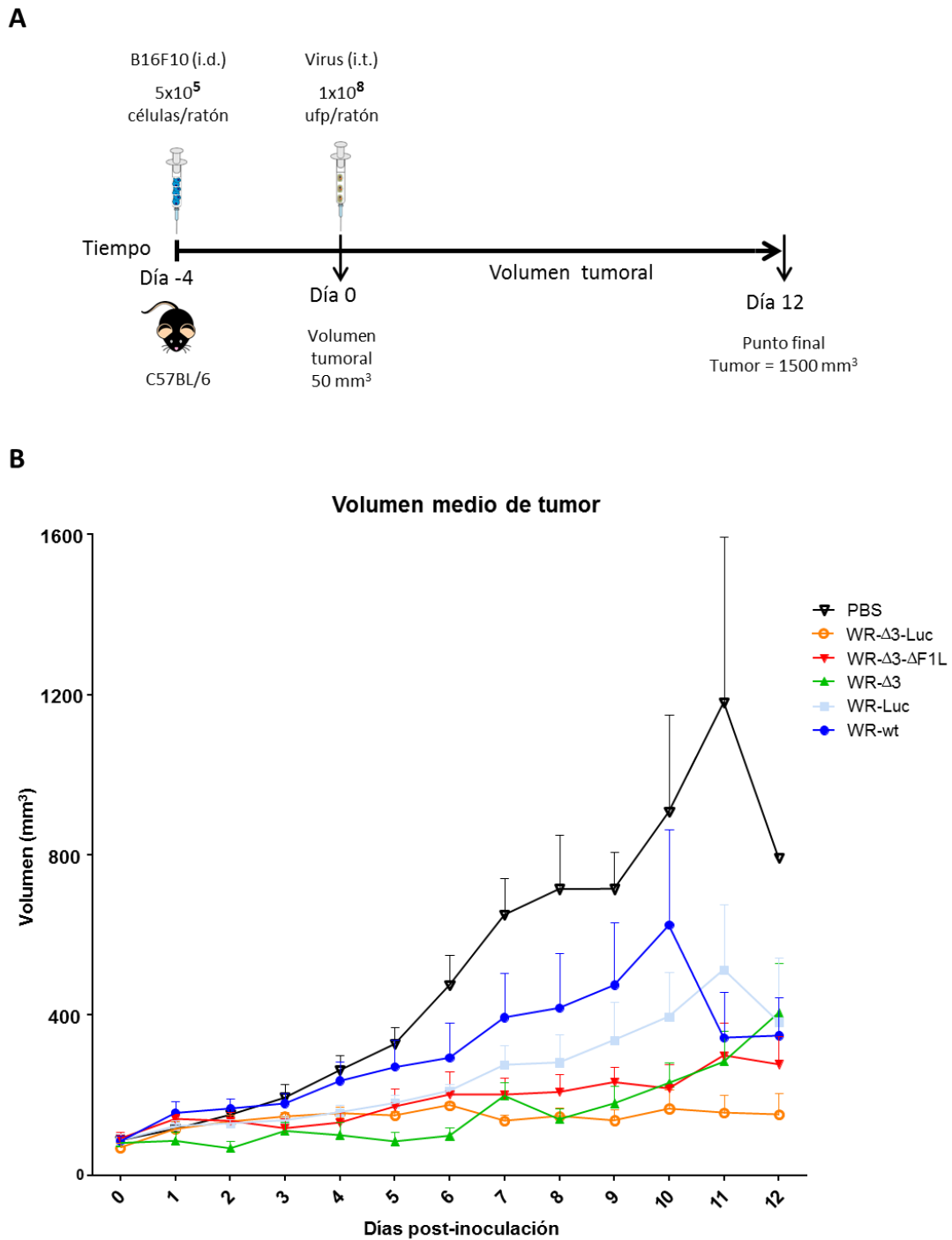


Figura 23. Estudio de la eficacia de los virus recombinantes en el control de la proliferación tumoral. A) Esquema de inmunización; se emplearon grupos de 7 hembras C57BL/6 por grupo de 7 semanas de edad. El criterio de punto final del

experimento está marcado por un volumen máximo de tumor de 1400-1500 mm³. B) Evolución de los volúmenes tumorales promedio de cada uno de los grupos representados frente a los días transcurridos desde la inoculación de los virus o el PBS (día 0). En la gráfica se representa la media de los valores y el error estándar de la media.

El análisis de la evolución individual de cada tumor por separado permite observar la variabilidad en cada grupo (**Figura 24**), de forma que en el grupo tratado con PBS todos los animales muestran un desarrollo tumoral similar teniendo que ser sacrificados según el criterio de punto final del experimento. Igualmente, los ratones tratados con los virus WR wt y WR-Luc, a pesar de mostrar un retraso generalizado respecto de la evolución tumoral observada en el grupo tratado con PBS, presentan una menor capacidad de controlar el crecimiento de los tumores en comparación con el resto de los virus mutantes de delección ensayados en el experimento. Los animales tratados con los virus WR- $\Delta 3$ y WR- $\Delta 3$ - $\Delta F1L$ muestran un perfil muy similar entre ellos, observándose un control general del crecimiento de los tumores hasta 8-9 días tras la administración de los inóculos y una tendencia posterior de un ligero aumento del volumen tumoral; en cambio, en los animales tratados con el virus WR- $\Delta 3$ -Luc se observa un crecimiento mínimo de los tumores hasta el final del experimento, manteniéndose éstos estables (**Figura 24**). Otro punto destacable es que en 1 ratón de cada grupo inmunizado con WR- $\Delta 3$, WR- $\Delta 3$ -Luc y WR- $\Delta 3$ - $\Delta F1L$ se produjo la completa eliminación del tumor tras la inoculación de los virus (**Figura 24**).

Este mismo efecto se refleja en los perfiles de los tumores tratados cuando se representa el incremento de volumen respecto del volumen de partida a lo largo del experimento (**Figura 25**). En el grupo control (PBS) y en los grupos en los que el tratamiento con los virus ha mostrado un menor control del crecimiento tumoral (WR wt y WR-Luc) se observaron incrementos crecientes, mostrando valores muy por encima de la tendencia observada en el resto de los grupos. Asimismo, cuando se comparan los grupos que han mostrado mayor retraso en el crecimiento tumoral, se puede observar como los ratones tratados con los virus WR- $\Delta 3$ y WR- $\Delta 3$ - $\Delta F1L$ muestran un incremento creciente del volumen tumoral respecto a su volumen al inicio del experimento, mientras que los animales tratados con el virus WR- $\Delta 3$ -Luc presentan un perfil de incremento del volumen tumoral mucho más estable y moderado a lo largo del experimento.

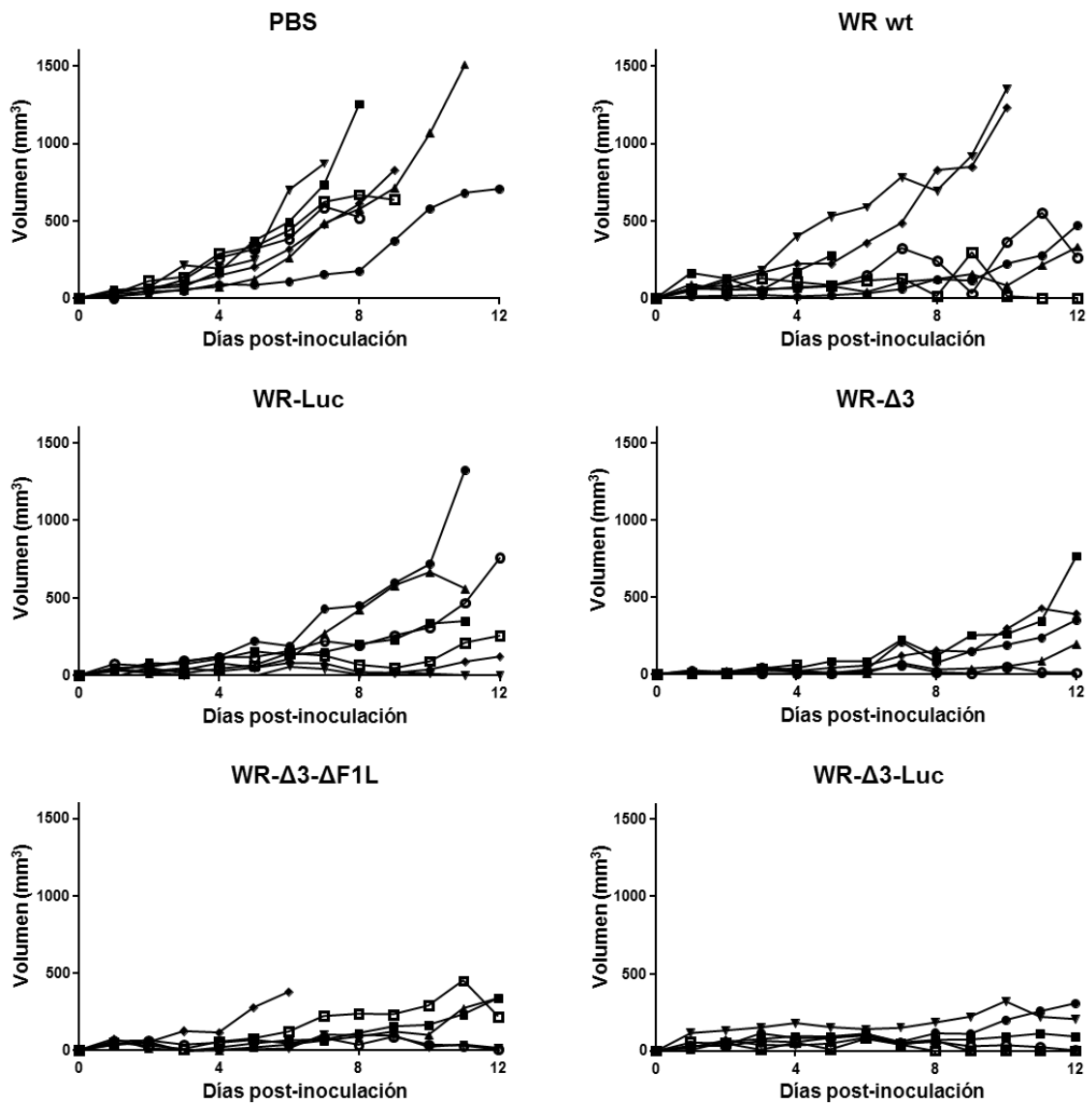


Figura 24. Evolución por ratón del volumen tumoral en animales tratados con los distintos vectores virales generados. Se representan los datos obtenidos para cada ratón tratado en cada uno de los grupos: PBS, WR wt, WR-Luc, WR- Δ 3, WR- Δ 3-Luc y WR- Δ 3- Δ F1L. Los datos se presentan habiendo sustraído el volumen tumoral inicial a día 0 en todos los tiempos medidos en cada una de las series de datos representadas.

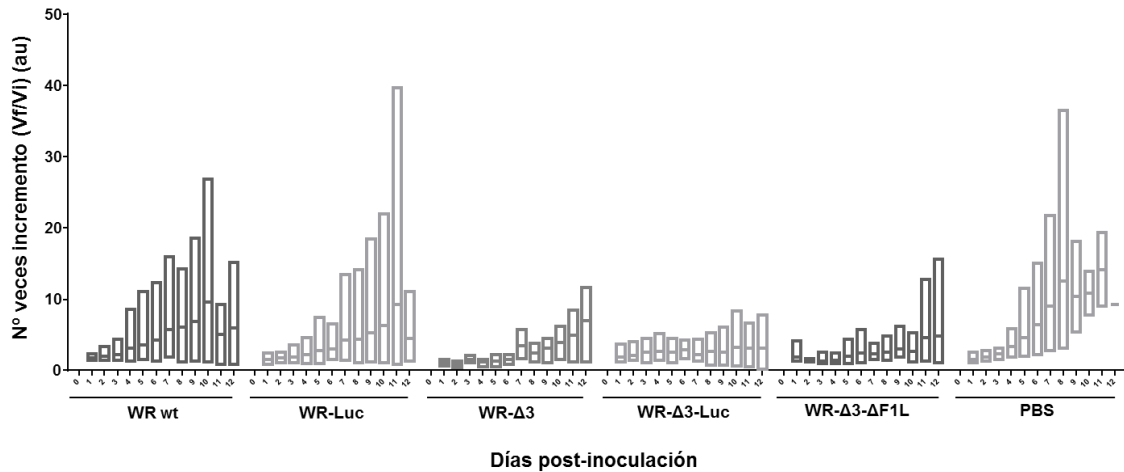


Figura 25. **Incremento en el volumen promedio de los tumores en animales tratados.** La gráfica representa la evolución del incremento del volumen tumoral calculado como el número de veces que el volumen inicial está contenido en la medida de volumen efectuada cada día post-inoculación (Volumen actual / Volumen inicial). Los valores representan el promedio de los incrementos obtenidos de todos los animales disponibles en cada grupo.

Para comparar los niveles de eficacia de cada uno de los virus recombinantes se ha tomado como punto final del experimento el día 12 (punto en el que se sacrificó al último animal del grupo control PBS), se ha restado a cada punto de tiempo el valor del volumen tumoral a día 0, se ha calculado el área bajo la curva de cada uno de los ratones tratados (**Figura 26 – Panel izquierdo**) y se ha representado el promedio de dichas áreas (**Figura 26 – Panel derecho**). Así, tal y como se puede observar, los virus que mostraban un desarrollo tumoral más controlado (WR-Δ3, WR-Δ3-Luc y WR-Δ3-ΔF1L), presentan una relación “volumen/días post-inoculación” significativamente menor en comparación con la observada en animales tratados con PBS. En cuanto a la comparación con el virus parental salvaje WR, el grupo tratado con el virus WR-Δ3-Luc es el único que presenta una diferencia significativa en reducción del área bajo la curva de desarrollo tumoral, mientras que los otros grupos muestran diferencias muy similares no significativas ($p = 0,08$).

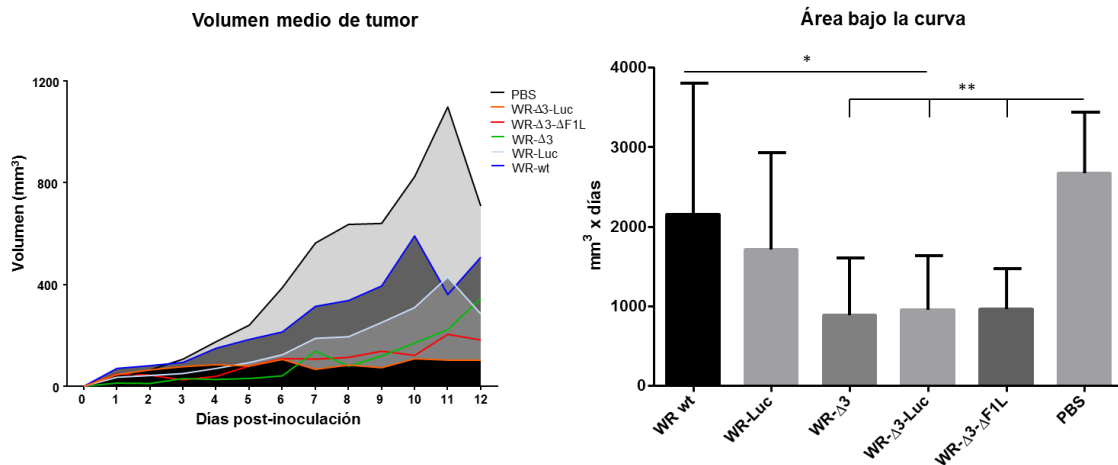


Figura 26. **Área bajo la curva en la evolución del volumen tumoral.** El área bajo la curva se ha calculado teniendo en cuenta el área que describen las distribuciones de datos (analizadas individualmente por ratón), habiendo restado en cada punto el valor del volumen de tumor a día 0 (Panel izquierdo). Las comparaciones se han llevado a cabo teniendo en cuenta el “área bajo la curva” de cada uno de los animales, y se han representado según la relación “mm³ / día”. En la gráfica se representa la media de los valores y la desviación estándar. El análisis estadístico se ha llevado a cabo empleando la prueba de ANOVA: *, p < 0,05; **, p < 0,01.

En conjunto, los resultados obtenidos muestran la capacidad oncolítica del virus vaccinia observándose diferentes grados de control del desarrollo de los tumores, resultando significativo el efecto de los virus WR-Δ3, WR-Δ3-Luc y WR-Δ3-ΔF1L. Los animales tratados con el virus WR-Δ3-Luc presentan los mejores resultados, destacando principalmente la evolución del volumen de los tumores, que muestra un perfil de incremento muy reducido a lo largo del experimento, en comparación con el resto de los grupos en los que se aprecia un mayor aumento en los volúmenes tumorales hacia los últimos días del experimento. Asimismo, también resulta destacable el hecho de que el fenotipo de control tumoral obtenido es resultado de la combinación de las deleciones llevadas a cabo, ya que los resultados difieren mucho cuando se trata de los virus parentales WR wt y WR-Luc. Los datos resultantes de este ensayo demuestran que una única dosis de los virus mutantes de deleción generados es eficaz en el control del crecimiento de tumores trasplantados de células B16F10 por encima de los resultados obtenidos en animales tratados con el virus parental salvaje WR.

4.9. Caracterización de los efectos del candidato oncolítico WR- Δ 3-Luc en un contexto tumoral.

Una vez establecido el virus WR- Δ 3-Luc como el candidato escogido por sus características conjuntas de eficacia terapéutica y seguridad de uso, se decidió analizar su comportamiento *in vivo*. Para ello, se diseñó un experimento en el que se realizó un trasplante singénico de células de melanoma B16F10 a ratones C57BL/6; cuando los tumores alcanzaron el tamaño adecuado se inocularon con los virus (WR wt o WR- Δ 3-Luc) o con PBS, y se realizó una cinética de seguimiento de 4 puntos: día 0 (estado de los tumores previo al tratamiento de los animales), y días 4, 8 y 12 post-inoculación. En cada punto, se analizaron el crecimiento tumoral, las poblaciones celulares del sistema inmune presentes en el tumor y en el bazo, el título viral en los tumores, y la respuesta inmune específica en células de bazo frente a 2 péptidos de antígenos asociados a melanoma (**Figura 27**).

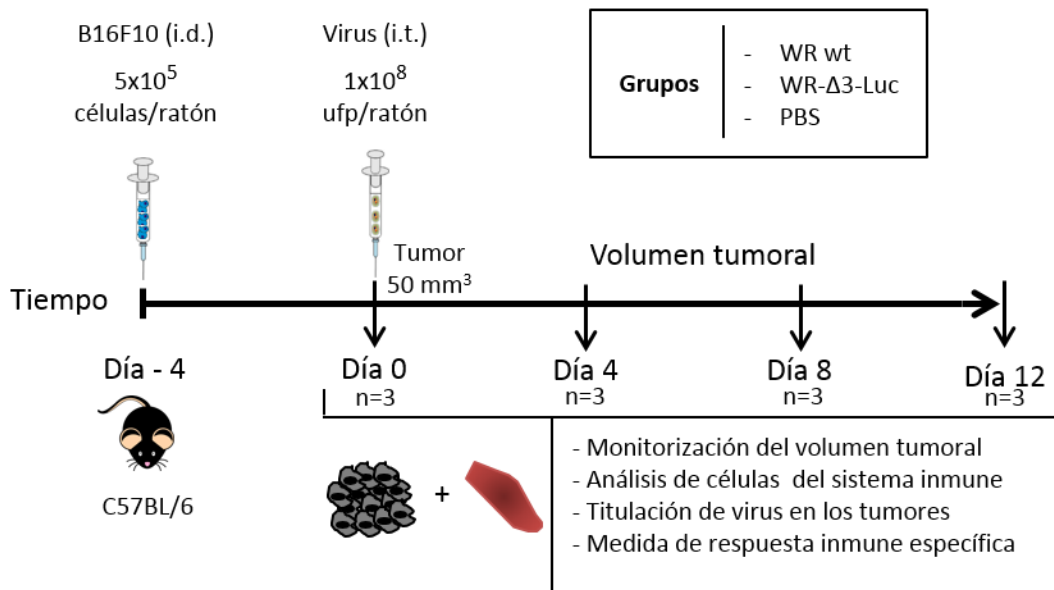


Figura 27. Esquema de la cinética de tratamiento de los tumores con el virus WR- Δ 3-Luc. Ratones hembras C57BL/6 de 7 semanas de edad fueron inoculadas con 5x10⁵ células B16F10/ratón por vía intradérmica y tratadas con 1x10⁸ ufp/ratón de virus 4 días después. El día 0 se sacrificaron 3 animales con tumores sin tratar, y los días 4, 8 y 12 tras la inoculación del virus, se sacrificaron 3 animales de cada grupo y de cada animal se extrajeron el tumor y el bazo, se procesaron tal y como se indica en el apartado 3.3.4. de la sección de materiales y métodos, y se realizaron los ensayos indicados. Los

animales que alcanzaron el volumen máximo tumoral establecido como criterio de punto final fueron sacrificados.

4.9.1. Análisis de la proliferación tumoral en animales con trasplantes de células B16F10.

Tal y como se hizo en el anterior ensayo descrito, los animales tratados con los virus WR wt y WR- Δ 3-Luc, y los animales control tratados con PBS se monitorizaron diariamente midiendo su peso corporal, posibles signos de enfermedad y volumen del tumor. Respecto al peso corporal y signos de enfermedad, ninguno de los animales de los 3 grupos analizados mostró una disminución significativa del peso ni síntomas aparentes de malestar, problemas de movilidad o de aspecto general a lo largo del experimento; ni siquiera cuando éstos alcanzaron el volumen de tumor crítico de punto final (1400-1500 mm³) (resultados no mostrados).

Atendiendo a la evolución de los volúmenes tumorales promedio a lo largo del experimento (**Figura 28**), se puede apreciar que los animales tratados con PBS muestran el mismo perfil observado previamente donde los tumores presentan un crecimiento constante y llegan a alcanzar los volúmenes tumorales más elevados; sin embargo, los animales que recibieron el tratamiento con los virus muestran un perfil de proliferación tumoral controlado, pudiéndose observar que los perfiles promedio de los animales tratados con WR- Δ 3-Luc muestran un mayor efecto oncolítico.

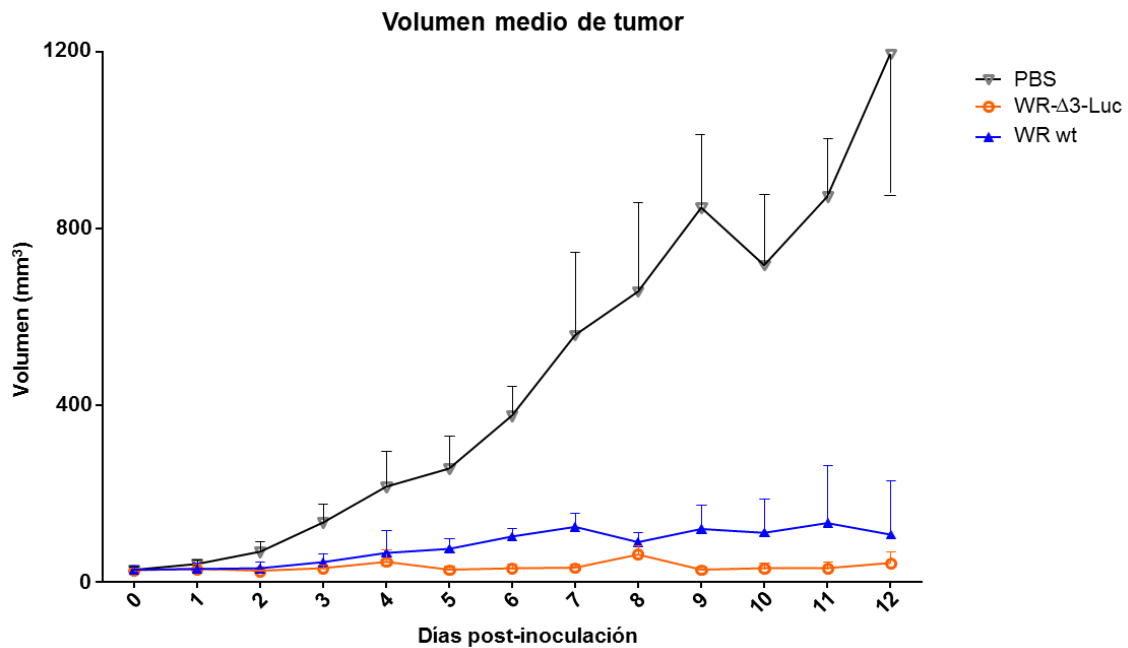


Figura 28. **Evolución de la proliferación tumoral media.** En la gráfica se muestran los valores medios de las medidas del volumen tumoral de todos los animales tratados a lo largo del experimento. Los valores de 0-4 días corresponde a 9 ratones, los comprendidos entre 4-8 días corresponden a 6 ratones y los observados entre los días 8-12 corresponden a 3 ratones por grupo. En la gráfica se representa la media de los valores y el error estándar de la media.

El alto grado de control del crecimiento tumoral observado se hace más patente al analizar la evolución del tumor de cada ratón en los distintos grupos (**Figura 29**). Así, todos los animales tratados con PBS muestran un crecimiento tumoral alto y continuado en los 3 tiempos post-inoculación estudiados (**Figura 29 – Paneles derechos**).

Asimismo, las diferencias entre los animales tratados con el virus salvaje WR y los tratados con el virus recombinante WR-Δ3-Luc también se pueden apreciar mejor analizando los perfiles individuales de crecimiento tumoral; de esta forma los animales del grupo inoculado con el virus WR wt (**Figura 29 – Paneles izquierdos**) muestran una tendencia de crecimiento mayor a la observada en los animales tratados con WR-Δ3-Luc (**Figura 29 – Paneles centrales**). Estas diferencias, aunque ya visibles en el día 4 post-inoculación, se hacen más evidentes a días 8 y 12 mostrando un perfil de crecimiento muy consistente e indicando que los animales tratados con el virus WR-Δ3-Luc controlan mejor el crecimiento de los tumores. En este estudio el grupo tratado con el virus salvaje WR ha mostrado mejor control del crecimiento tumoral. Este resultado

contrasta con el obtenido en el anterior ensayo (**Figura 23.B**), pero es similar al obtenido en ensayos previos (resultados no mostrados). Esto puede estar debido a que la formación de los tumores en el presente experimento ha sido más consistente facilitando la administración intratumoral del virus.

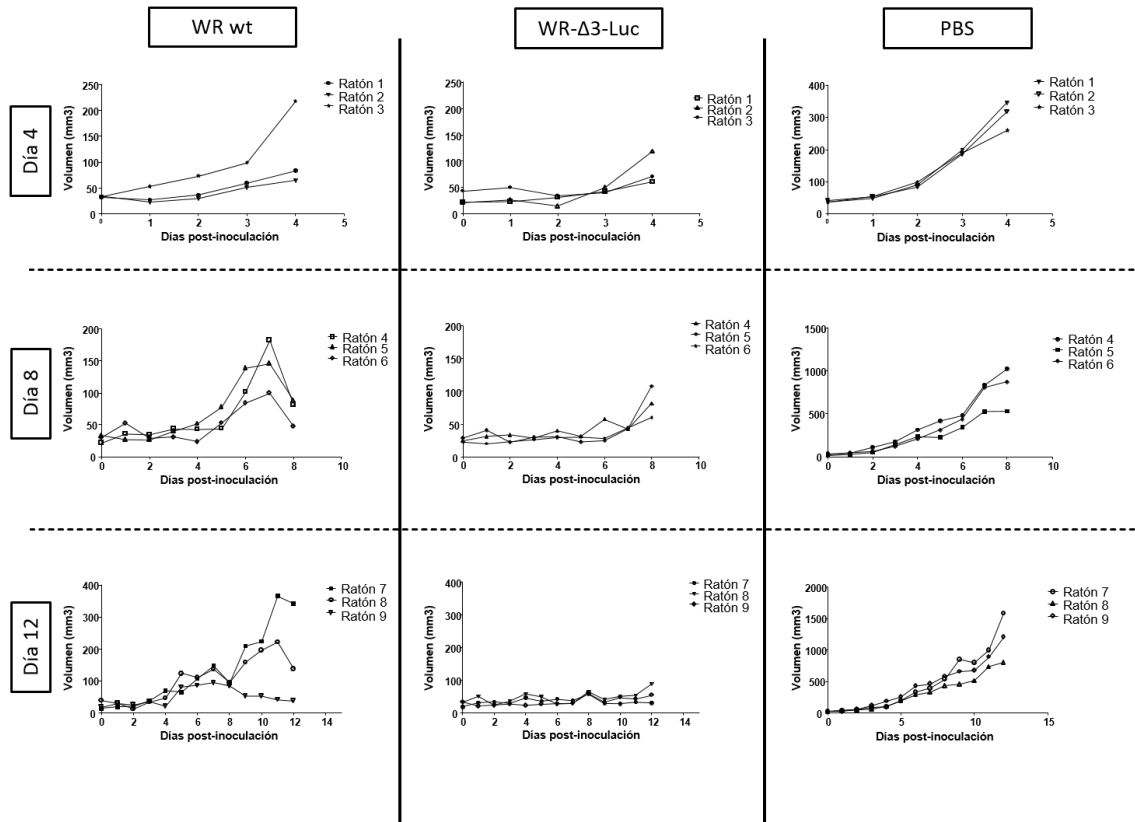


Figura 29. Evolución del volumen tumoral individual en la cinética de tratamiento. Se muestra la evolución de los volúmenes de tumores de animales tratados con los virus WR wt (Paneles izquierdos), WR- Δ 3-Luc (Paneles centrales) o PBS (Paneles derechos), recogiendo los datos diariamente y agrupándolos en los puntos de la cinética de día 4, 8 y 12.

Los resultados mostrados anteriormente fueron confirmados al analizar el perfil de incremento del volumen tumoral a lo largo del tiempo. Como se puede observar en la **Figura 30**, el incremento medio del volumen tumoral en los animales tratados con PBS muestra un aumento del volumen inicial a lo largo del tiempo mucho mayor que el observado en los animales tratados con los virus, llegando a alcanzar volúmenes de hasta 60 veces superiores al volumen inicial. De nuevo, la evolución del incremento del volumen tumoral muestra un perfil en el que los animales tratados con WR wt exhiben un aumento en el crecimiento del volumen de los tumores según avanza el tiempo

(Figura 30), exhibiendo valores medios de incremento de los primeros 4 días muy similares a los observados en el grupo tratado con el virus WR- Δ 3-Luc y observándose que a partir del día 4, los valores medios de incremento aumentan (alcanzando incrementos de hasta 20 veces el volumen del tumor a día 0). Sin embargo, en los animales tratados con el virus WR- Δ 3-Luc el perfil de incremento tumoral muestra valores de volúmenes medios mínimos incluso en la última etapa del experimento.

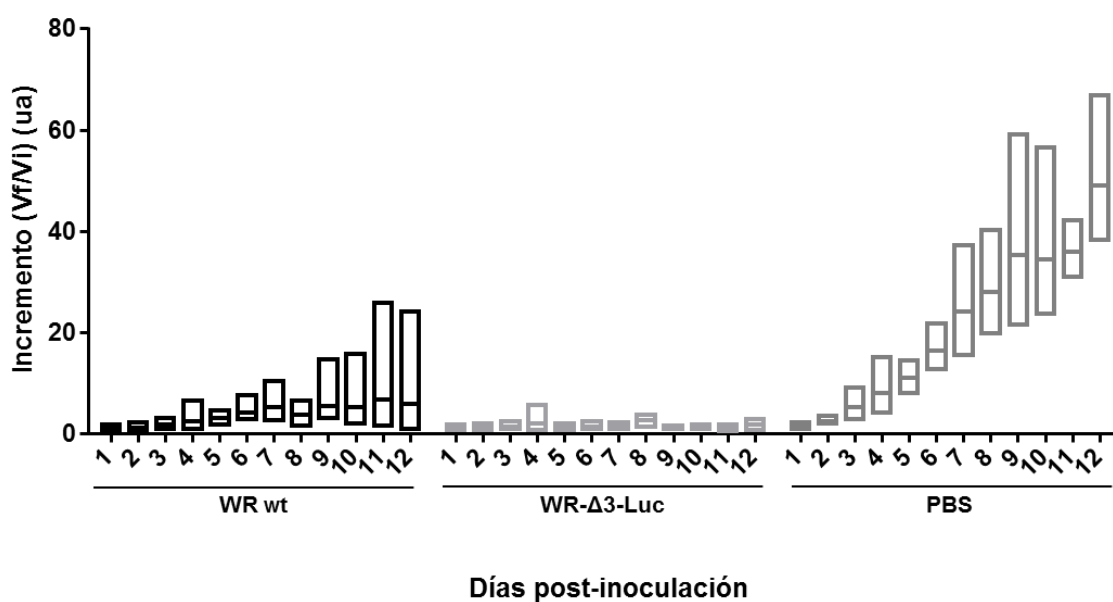


Figura 30. **Valores medios de incremento en los volúmenes tumorales.** Se representa la evolución del incremento del volumen tumoral calculado como el número de veces que el volumen inicial está contenido en la medida de volumen efectuada cada día post-inoculación ($\text{Volumen actual} / \text{Volumen inicial}$). Los valores representan el promedio de los incrementos obtenidos de todos los animales disponibles en cada grupo.

A las características anteriormente descritas, se suma el hecho de que 2 ratones del grupo tratado con WR wt y 3 ratones tratados con el virus WR- Δ 3-Luc, habiendo desarrollado tumor al igual que el resto de animales, mostraron a partir del día 10 post-inoculación una completa recuperación y eliminaron completamente el tumor de la zona en la que se había realizado el trasplante, dejando únicamente una pequeña cicatriz. Este efecto se puede observar en la **Figura 31**, donde se aprecia el tamaño que muestran los tumores en los animales tratados con PBS en comparación con los ratones tratados con

los virus. De la misma forma, y a pesar de que el tratamiento con ambos virus produce un aumento visible del control tumoral, la diferencia de tamaño de tumor observada entre los dos virus evidencia un mayor control del tumor en los animales tratados con el mutante de delección WR- Δ 3-Luc.

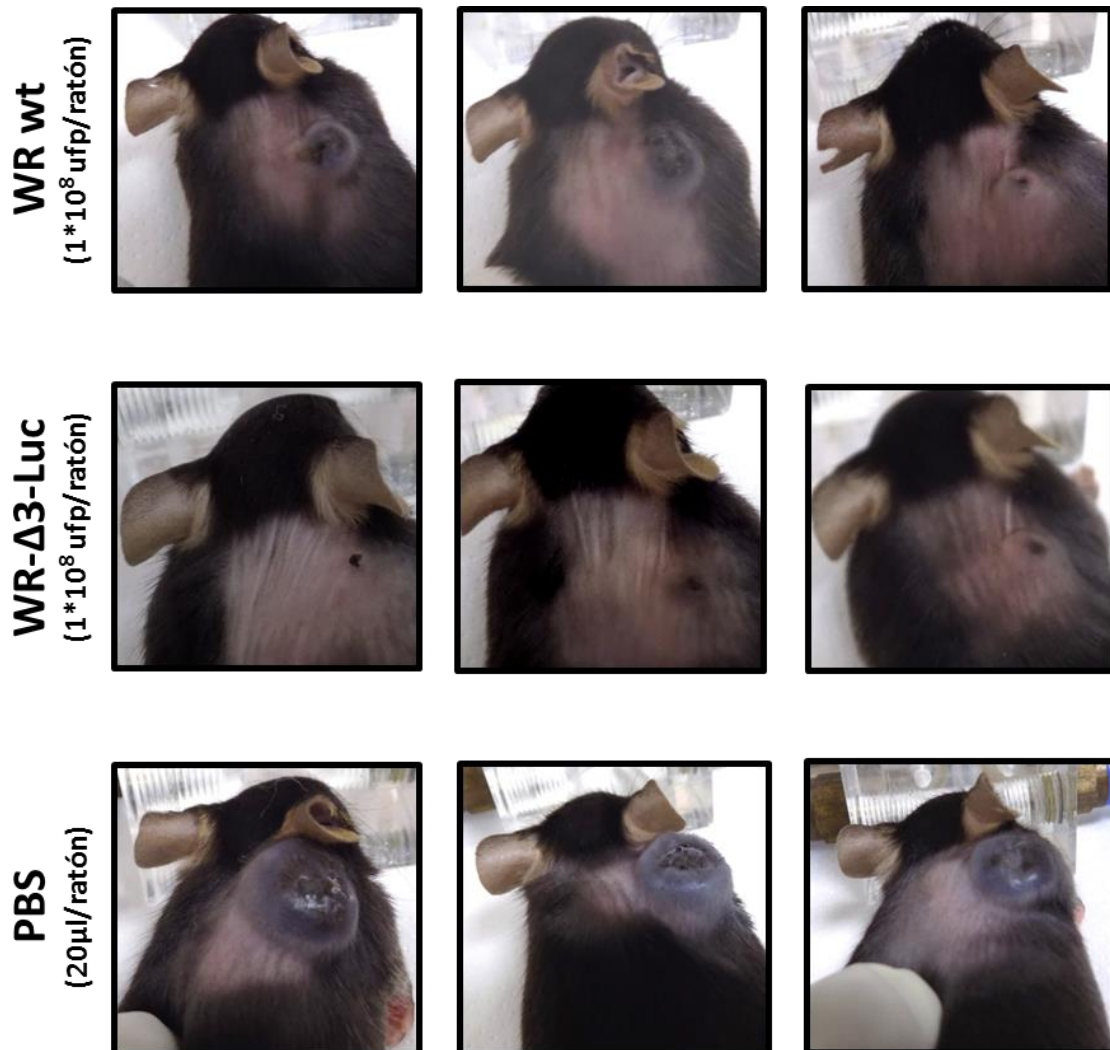


Figura 31. **Estado de los tumores a día 12 post-inoculación.** Fotografías de los animales tratados con WR wt, WR- Δ 3-Luc o PBS 12 días después de la administración de los inóculos.

Finalmente, se determinó el área bajo la curva de los volúmenes tumorales y se evaluaron comparativamente las diferencias observadas entre grupos. Las áreas obtenidas corresponden a la media de los valores de cada ratón (3 ratones por grupo y

punto de tiempo) y se han representado dividiendo los datos según los tres puntos de tiempo tomados (**Figura 32.A**). Así, tal y como se observa en la **Figura 32.B**, se detectan diferencias significativas entre el grupo tratado con PBS y los grupos tratados con WR wt o WR-Δ3-Luc desde el primer punto de tiempo analizado a 4 días post-inoculación, y aumentando significativamente esta diferencia a medida que pasa el tiempo. De la misma forma, se puede apreciar que a partir del día 8 post-inoculación el área observada en los animales tratados con WR-Δ3-Luc es significativamente inferior a la obtenida en animales tratados con WR wt y por tanto el control tumoral proporcionado por el virus mutante de delección es mayor (alcanzando la mayor diferencia a día 12 post-inoculación).

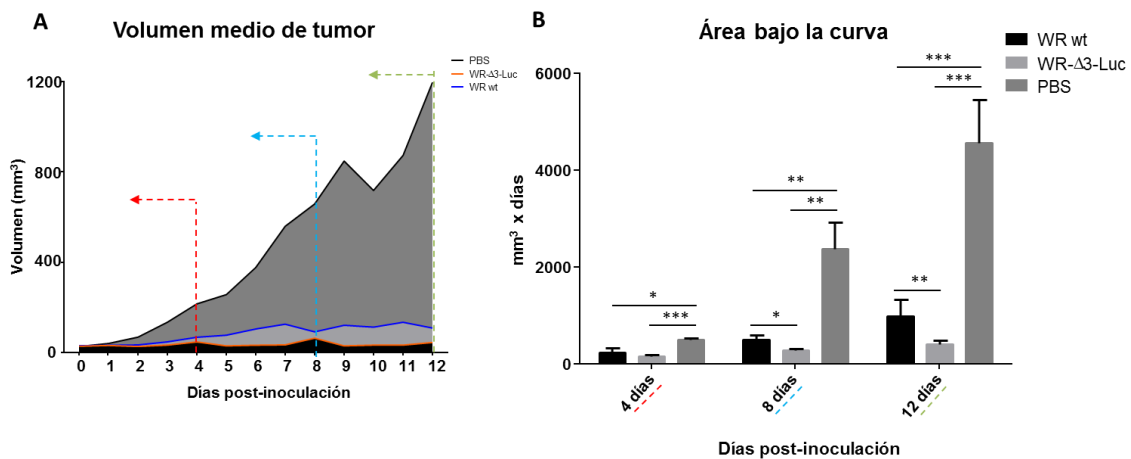


Figura 32. **Área bajo la curva en la evolución del volumen tumoral.** A) El área bajo la curva se ha calculado teniendo en cuenta el área que describen las distribuciones de datos (analizadas individualmente por ratón) habiendo restado en cada punto el valor del volumen de tumor a día 0. Los valores medios se han calculado dividiendo a los animales entre los 3 puntos de tiempo estudiados: día 4 (línea discontinua roja), día 8 (línea discontinua azul) y día 12 (línea discontinua verde). B) La representación de los datos se ha llevado a cabo dividiendo los ratones según el orden en el que fueron sacrificados en la cinética programada (4, 8 y 12 días post-inoculación); las comparaciones se han llevado a cabo teniendo en cuenta el “área bajo la curva” de cada uno de los animales y se han representado según la relación “mm³ x día”. Se han empleado 3 animales por grupo y por punto de tiempo analizado. En la gráfica se representa la media de los valores y la desviación estándar. El análisis estadístico se ha llevado a cabo empleando la prueba ANOVA: *, p < 0,05; **, p < 0,01; ***, p < 0,005.

4.9.2. Análisis de la persistencia de la infección viral en los tumores tratados.

Uno de los principales pilares en la estrategia de emplear vectores virales como agentes oncolíticos se centra en la capacidad de los virus de infectar y persistir en el tumor, de forma que actúe lisando las células tumorales y controle así el crecimiento tumoral. Ya se ha visto que tras una administración sistémica, los virus mutantes de delección son capaces de infectar y replicar en tejidos sanos *in vivo*, mostrando distintos grados de replicación respecto del comportamiento observado en el virus salvaje WR. Partiendo de esta observación, se decidió estudiar a continuación la presencia de virus en los tumores 4, 8 y 12 días después de la administración de los inóculos. Las muestras fueron tomadas según se detalla en el apartado 3.3.4.2.2. de materiales y métodos, y se titularon corrigiendo los valores de título en relación al volumen tumoral alcanzado en el momento del sacrificio de cada ratón.

Los datos obtenidos en el punto de 4 días (**Figura 33.A**) muestran que los grupos inmunizados con los virus WR wt o WR- Δ 3-Luc presentan títulos virales en torno a las 10^5 ufp/mm³, sin encontrar diferencias significativas entre los títulos de ambos virus. 8 días después de la inmunización (**Figura 33.B**), los tumores continúan estando infectados con títulos entre 10^4 - 10^5 ufp/mm³, tanto para los animales tratados con el virus salvaje WR, como para los tratados con el virus WR- Δ 3-Luc; en este punto siguen sin observarse diferencias significativas entre los virus. Finalmente, en el punto de 12 días post-inoculación (**Figura 33.C**) se siguen detectando partículas infectivas de virus en los animales tratados; y aunque la media de título viral desciende ligeramente hasta 10^4 ufp/mm³, las diferencias detectadas en los títulos entre ambos virus no muestran una diferencia significativa.

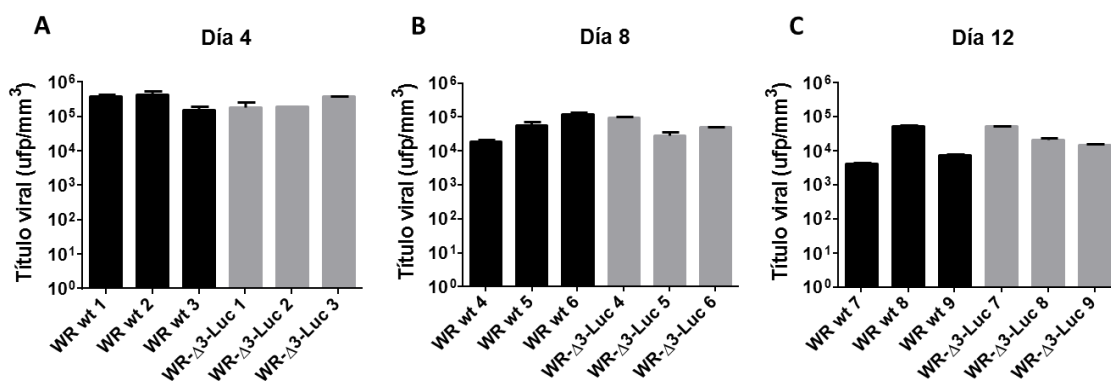


Figura 33. **Análisis del título viral en tumores trasplantados de células B16F10.** Se representan los títulos virales obtenidos en la cinética de los tumores del día 4 (A), del día 8 (B) y del día 12 (C). Los valores de título se han corregido teniendo en cuenta los volúmenes tumorales de cada ratón en el mismo día del sacrificio y se expresan como unidades formadoras de placas por mm^3 . Los datos corresponden a la media de dos titulaciones por cada tumor y se representa su desviación estándar.

Tal y como muestran los resultados obtenidos, el comportamiento del virus salvaje WR y del virus WR- $\Delta 3$ -Luc son similares en lo que se refiere a la replicación y persistencia de infección en los tumores. Además, se puede observar que a pesar de experimentar una ligera disminución según avanza el tiempo, los títulos virales se mantienen altos incluso 12 días después de su inoculación (teniendo en cuenta que, de partida, el título medio aproximado de virus inyectado era de 3×10^6 ufp/ mm^3). De esta forma, se observa que la oncolisis viral desempeña un papel clave en el control del crecimiento tumoral y que las deleciones llevadas a cabo en el virus WR- $\Delta 3$ -Luc no representan ningún impedimento en lo que se refiere a la infección y replicación en un contexto tumoral *in vivo* (habiendo mostrado un comportamiento muy similar al observado en el virus salvaje parental WR).

4.9.3. Migración de las poblaciones celulares del sistema inmune en ratones con tumores trasplantados en un contexto de infección por vaccinia.

Durante la caracterización de los virus mutantes de deleción generados se pudo observar que tras una infección con los vectores de la cepa WR del virus vaccinia se producía a tiempos tempranos la migración hacia o desde el sitio de infección de células involucradas en la respuesta innata frente al virus. Por esta razón, se decidieron estudiar los flujos de células del sistema inmune en los tumores y los bazo de animales tratados con el virus oncolítico candidato WR- $\Delta 3$ -Luc, para así poder compararlos con los obtenidos en los animales tratados con el virus parental WR wt y los tratados con PBS. Se evaluaron inicialmente las distintas poblaciones celulares a día 0 (previo a la administración de los inóculos) en tumor y en bazo, y se consideraron los valores obtenidos como el nivel basal de partida; a partir de este punto los niveles evolucionarían normalmente en el caso de los ratones tratados con PBS y podrían apreciarse las posibles implicaciones que los cambios observados en los animales

tratados con virus podrían tener en la contribución del control del crecimiento tumoral registrado.

Al igual que se pudo observar en los ensayos de migración en exudados peritoneales, se produce una migración significativa de neutrófilos hacia los tumores tratados con el virus WR-Δ3-Luc en comparación a los valores observados en los tumores de ratones tratados con PBS, que mantienen durante todo el experimento niveles de neutrófilos semejantes a los mostrados en los tumores sin tratar a día 0 (**Figura 34**). Asimismo, a día 12 se puede apreciar un incremento significativo en el número de neutrófilos en los tumores de animales tratados con WR-Δ3-Luc en comparación con el grupo de WR wt.

Respecto a los monocitos (**Figura 34**), los valores oscilan entre grupos y días post-inoculación, mostrando un ligero aumento en el número de células a los 12 días en los grupos WR-Δ3-Luc y PBS. Aunque los valores observados no muestran diferencias significativas entre los grupos, los tumores experimentan un aumento del número de monocitos respecto al registrado a día 0 en todos los casos.

Cuando se analizaron los macrófagos, en todos los puntos post-inoculación estudiados se observó un número de células inferior (o igual en el caso del grupo PBS a día 12) a los detectados a día 0 en tumores sin tratar (**Figura 34**). Así, se puede concluir que en el modelo de trasplante de células de melanoma B16F10 el número total de macrófagos tiende a mantenerse al mismo nivel, o ligeramente por debajo, en animales tratados con PBS respecto de los valores registrados a día 0 en tumores sin tratar; mientras que en los tumores tratados con virus se observa un descenso de los niveles de células totales en todos los puntos de tiempo estudiados, mostrando un perfil muy similar al observado en los estudios de migración en exudados peritoneales donde se observaba una fuerte disminución en el peritoneo en tiempos tempranos tras la infección de los animales.

Un perfil muy similar puede observarse en células dendríticas y células NK (**Figura 34**), teniendo en cuenta que el número total de células dendríticas en los animales tratados con virus (<200 células/mm³) se encuentra muy por debajo en comparación con las células NK (≤ 5000 células/mm³). El perfil observado en ambos casos, muestra en todos los puntos post-inoculación en los tumores tratados con virus niveles de células al nivel o por debajo de los detectados a día 0; sin embargo, en los tumores tratados con PBS se observan en general niveles de células significativamente superiores a los

registrados para los ratones tratados con virus (a excepción de la células dendríticas a día 8 y las células NK a día 4) y siempre por encima de los observados a día 0.

En el caso de las células NKT (**Figura 34**), los ratones tratados con el virus salvaje WR o el virus WR- Δ 3-Luc muestran niveles semejantes en todos los puntos de la cinética, permaneciendo estables desde el principio del experimento, mientras que los tumores tratados con PBS mantienen niveles similares al de los tratados con los virus a días 4 y 8, experimentando un incremento significativo a día 12. En todos los casos, se han mostrado niveles de células/mm³ por encima de los detectados a día 0.

El análisis de los linfocitos B (**Figura 34**), muestra que a día 4 los valores obtenidos en todos los grupos permanecen al nivel de los registrados a día 0; sin embargo, a día 8 los animales tratados con los virus muestran una infiltración de linfocitos B estadísticamente significativa en comparación con los niveles observados en los ratones tratados con PBS. A día 12, el número de células detectadas en el grupo tratado con el virus salvaje WR disminuye, mientras que se mantiene en el grupo tratado con el virus mutante de delección WR- Δ 3-Luc y aumenta en el grupo tratado con PBS. A día 8 y 12, todos los grupos presentan niveles de linfocitos B por encima de los registrados a día 0.

Finalmente, para los valores de linfocitos T CD4 y CD8, nuevamente se puede observar un comportamiento similar en cuanto a la participación de estas células del sistema inmune en el contexto de tumores infectados por WR wt o WR- Δ 3-luc. Para los linfocitos T CD4 (**Figura 34**) los niveles permanecen estables y con valores similares o por debajo de los detectados al inicio del experimento (registrándose los valores más bajos de células/mm³ en los tumores tratados con WR- Δ 3-luc). Para los linfocitos T CD8 (**Figura 34**) ambos grupos de ratones tratados con virus muestran los mismos niveles de linfocitos T CD8 estando por encima de los observados en los ratones tratados con PBS los días 4 y 8 (además, siendo éstos ligeramente superiores los días 8 y 12). En el caso del grupo PBS, tanto para linfocitos T CD4 como para CD8, se observan niveles inferiores a los observados en tumores a día 0, mientras que a día 12 experimentan un aumento significativo en la migración hacia los tumores en comparación con los animales tratados con virus. También se observó que había un mayor número de linfocitos T CD8 en los tumores (2000-15000 células/mm³) que de linfocitos T CD4 (1000-8000 células/mm³).

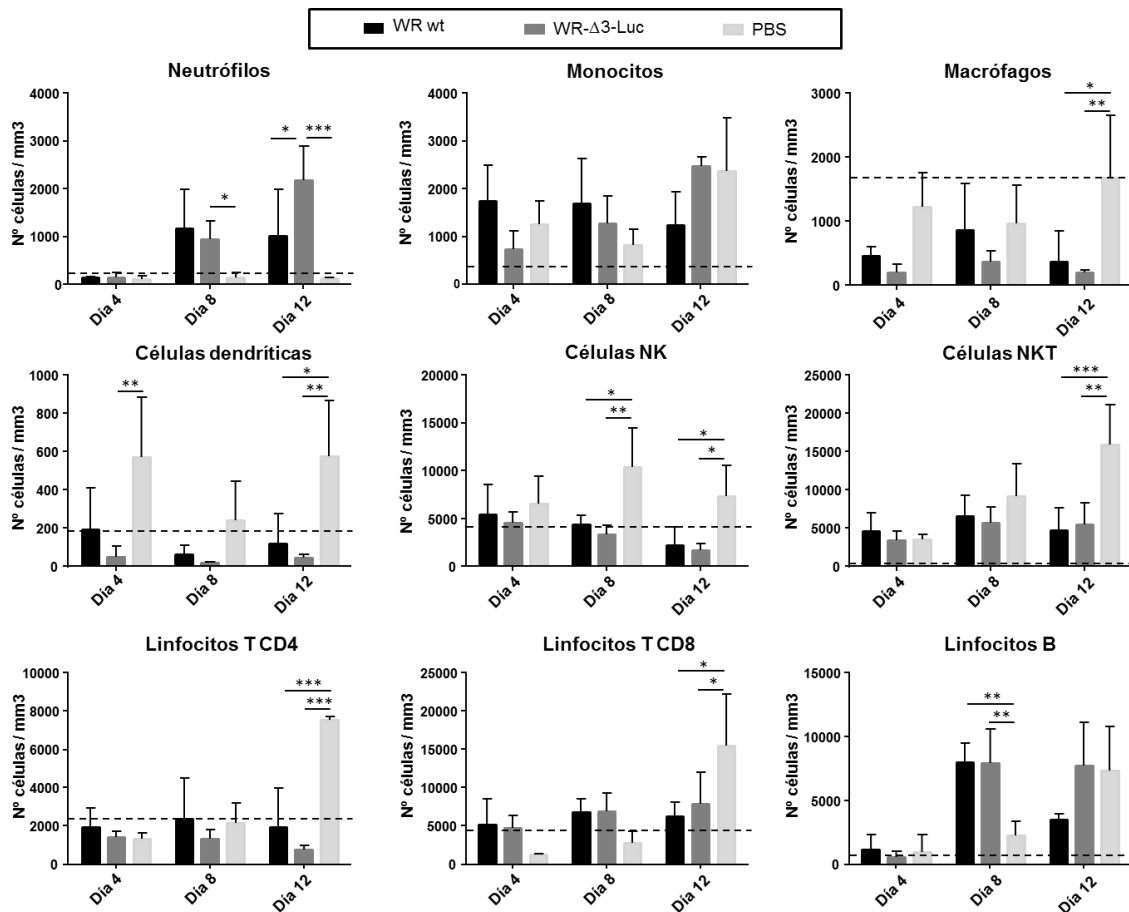


Figura 34. **Frecuencias de poblaciones del sistema inmune en tumores B16F10 infectados.** Aparecen representados los niveles de células para los días 4, 8 y 12 post-inoculación de las poblaciones de: Neutrófilos, Monocitos, Macrófagos, Células dendríticas, Células NK, Células NKT, Linfocitos T CD4, Linfocitos T CD8, y Linfocitos B. Las muestras corresponden al promedio de los valores obtenidos de 3 ratones por grupo y por punto de tiempo analizado. Los valores corresponden al número total de células por mm³ de tumor (considerando en cada caso los volúmenes de tumor de cada ratón) y se representan los valores de células/mm³ de animales sin tratar a día 0 con una línea discontinua en cada una de las gráficas. En las gráficas se representa la media de los valores y la desviación estándar. El análisis estadístico se ha llevado a cabo empleando la prueba ANOVA: *, p < 0,05; **, p < 0,01; ***, p < 0,005.

Además de los niveles totales de linfocitos T CD4 y CD8, se decidió analizar los niveles de los marcadores CD69 y PD-1 para determinar la activación de los linfocitos infiltrados en tumor, así como el grado de anergia inducido por el microambiente

tumoral, respectivamente. El marcador CD69 es una lectina tipo C que se emplea como marcador de activación, y que se encuentra expresada en células T activadas, B, NK y monocitos en ratones tratados con LPS (Tough *et al.*, 1997); y PD-1 es miembro de la familia CD28/CTLA-4, que ha demostrado su papel como regulador negativo en la señalización de los receptores de las células T y la disminución de proliferación y producción de citoquinas (Barber *et al.*, 2006; Chen, 2004), así como se ha demostrado que es un componente clave en el fenotipo de células T exhaustas (Day *et al.*, 2006; Jin *et al.*, 2010; Sakuishi *et al.*, 2010). Los niveles de CD69 y PD-1 se analizaron calculando la intensidad de fluorescencia media (IFM) de los eventos considerados como positivos para los marcadores dentro de las poblaciones de CD4 y CD8. Los resultados mostraron que las diferencias en los niveles de CD69 (**Figura 35.A**) permanecían constantes a lo largo del experimento, observándose en los linfocitos T CD8 niveles similares en los animales tratados con virus, mientras que los animales tratados con PBS mostraban niveles significativamente más altos (igualándose todos los grupos a día 12). En los linfocitos T CD4 se observaron niveles similares los días 4 y 8, pudiendo apreciarse un leve aumento en los grupos tratados con virus respecto al tratado con PBS a día 12. Sin embargo, para los valores de IFM de PD-1 (**Figura 35.B**), los linfocitos T CD4 y CD8 de animales tratados con virus mostraban niveles significativamente superiores a los observados en los ratones tratados con PBS los días 4 y 8, alcanzando todos los grupos niveles similares el día 12. Así, los ratones tratados con virus en los que se observa un mayor control tumoral, presentan linfocitos T CD4 y CD8 infiltrados en tumor con menor nivel de activación (CD69) y mayor nivel del marcador de anergia (PD-1).

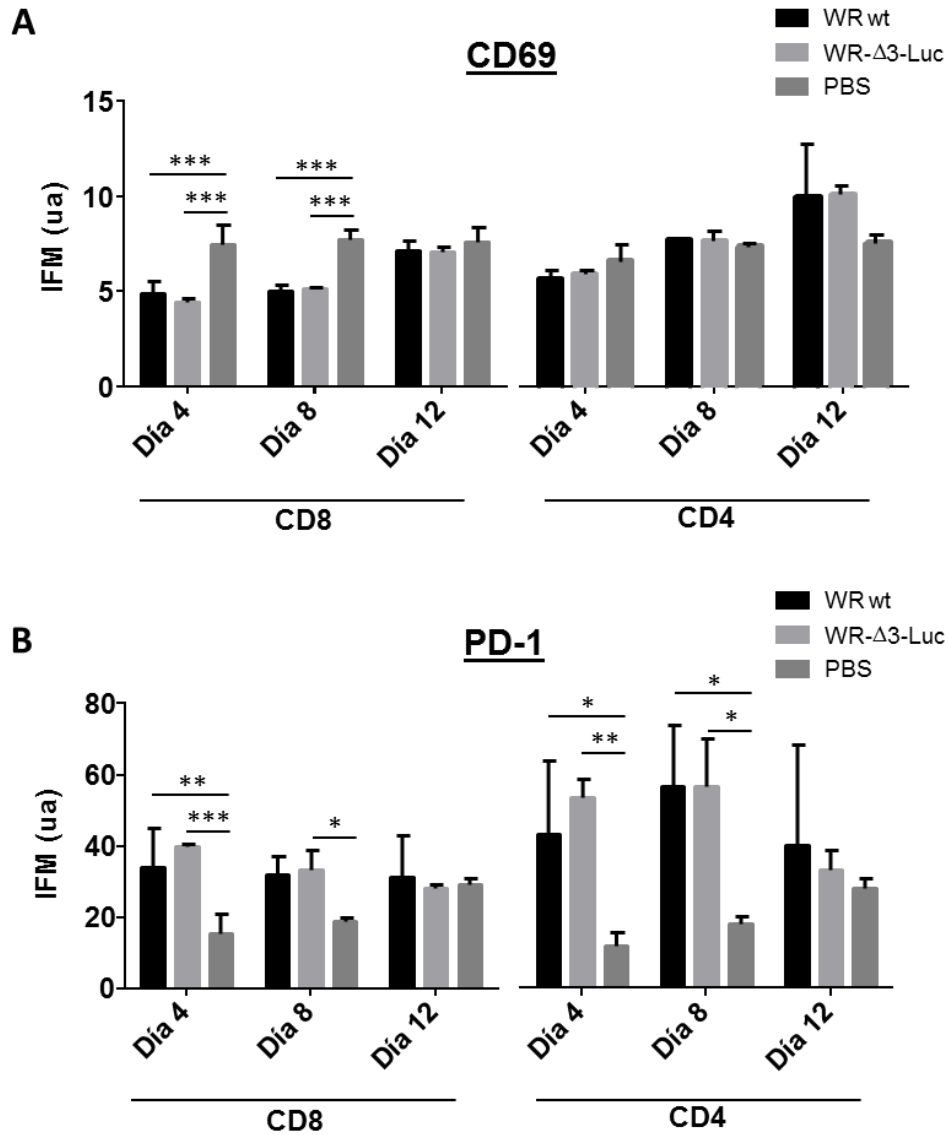


Figura 35. **Expresión de CD69 y PD-1 en linfocitos T CD4 y CD8 en tumores tratados con virus.** Se muestran los valores de “Intensidad de Fluorescencia Media” de los marcadores CD69 (A) y PD-1 (B); los valores de IFM se han calculado sobre las poblaciones de linfocitos T CD4 y CD8 positivas para los marcadores analizados en las muestras de tumores a días 4, 8 y 12 tras la administración intratumoral de los virus. En las gráficas se representa la media de los valores y la desviación estándar. El análisis estadístico se ha llevado a cabo empleando la prueba ANOVA: *, $p < 0,05$; **, $p < 0,01$; ***, $p < 0,005$.

También se llevó a cabo el análisis de la migración desde/hacia el bazo, como medida indirecta de la respuesta inmune que estaba teniendo lugar en los tumores, aunque la

evolución de los valores observados no mostraron cambios significativos entre grupos a lo largo del experimento; sin embargo, sí que se pudo observar un cambio drástico entre el punto de 4 días y los puntos de 8 y 12 días post-inoculación, mostrando un aumento en el reclutamiento de todas las poblaciones celulares estudiadas en los bazos de todos los grupos (excepto para las células NK y NKT que se mostraron en torno al nivel observado a día 0) (**Figura 36**). Únicamente se encontraron diferencias significativas en la disminución a día 4 de células NK y NKT (***, $p < 0,005$) en los ratones tratados con virus (valores que se normalizaban e igualaban a los mostrados por los ratones tratados con PBS durante los días 8 y 12); y en un aumento en los valores de linfocitos T CD4 y CD8, donde a día 4 post-inoculación todos los grupos presentaban valores por debajo de los observados a día 0, pero a día 8 los ratones tratados con virus mostraban un número de linfocitos infiltrados significativamente superior a los observados en los ratones tratados con PBS (***, $p < 0,005$); esta diferencia disminuye a día 12 pero los valores de células en bazos de animales infectados siguen estando por encima de los tratados con PBS (en todos los casos los valores observados entre los ratones tratados con ambos virus son muy similares) (**Figura 36**). Respecto a los valores de expresión medios de los marcadores CD69 y PD-1 en linfocitos T CD4 y CD8, éstos se mantuvieron invariables entre grupos y días post-inoculación a lo largo de todo el experimento (resultados no mostrados). Asimismo, en estudios preliminares se analizó la migración de poblaciones en los nódulos linfáticos drenantes axilares e inguinales cercanos a la zona del trasplante de las células tumorales y tampoco se pudieron observar cambios significativos en ninguna de las poblaciones celulares estudiadas (datos no mostrados).

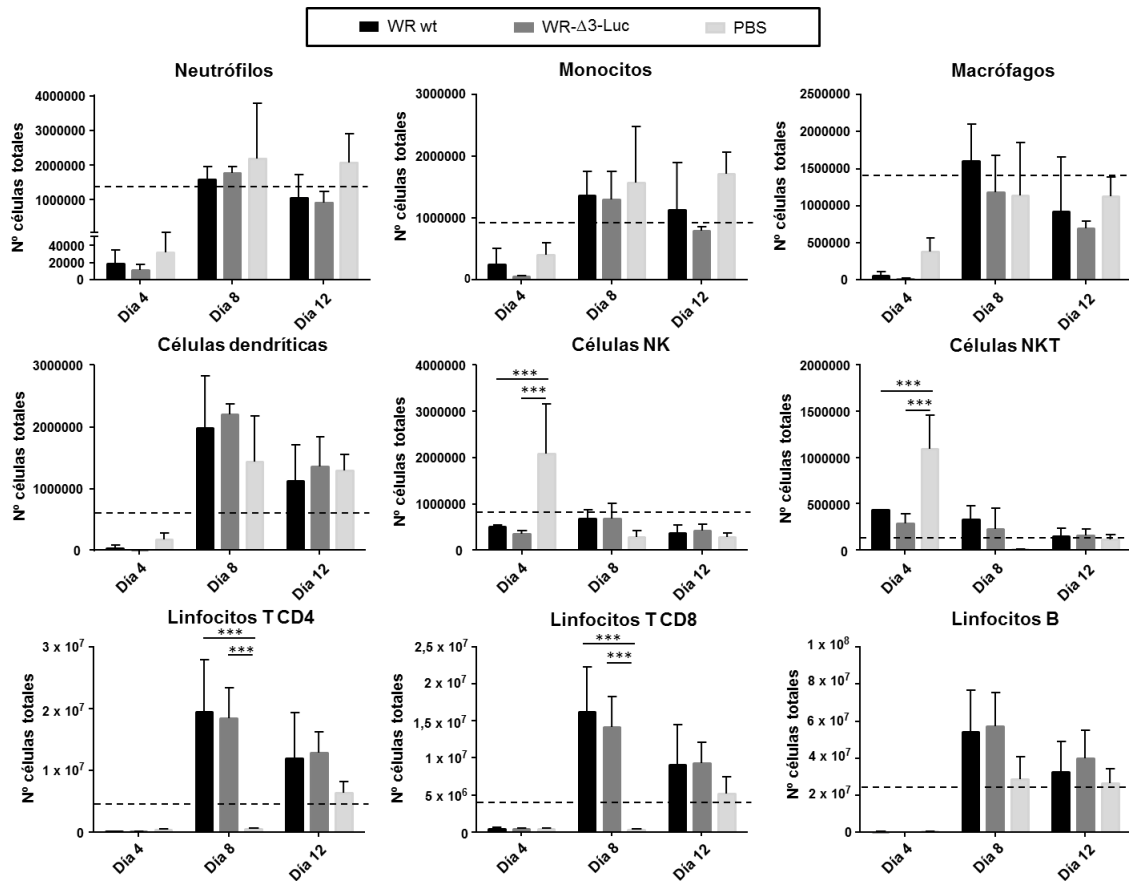


Figura 36. **Migración de poblaciones del sistema inmune en bazos de animales trasplantados con células B16F10 e infectados.** Aparecen representados los niveles de células para los días 4, 8 y 12 post-inoculación de las poblaciones de: Neutrófilos, Monocitos, Macrófagos, Células dendríticas, Células NK, Células NKT, Linfocitos T CD4, Linfocitos T CD8, y Linfocitos B. Las muestras corresponden al promedio de los valores obtenidos de 3 ratones por grupo y por punto de tiempo analizado. Los valores corresponden al número total de células y se representan los valores totales de células de animales sin tratar a día 0 con una línea discontinua en cada una de las gráficas. En las gráficas se representa la media de los valores y la desviación estándar. El análisis estadístico se ha llevado a cabo empleando la prueba ANOVA: ***, $p < 0,005$.

Por lo tanto, en los estudios hechos sobre la migración en los tumores, se ha podido observar que los ratones tratados con los virus WR wt y WR-Δ3-Luc mantienen las poblaciones celulares analizadas al nivel de los valores obtenidos a día 0 (células NK, linfocitos T CD4 y linfocitos T CD8) o por debajo (macrófagos y células dendríticas). En todos estos casos los animales tratados con PBS mostraban valores superiores al

observado en los ratones tratados con virus, haciéndose más patente esta diferencia el día 12 post-inoculación. A este respecto, no se observaron diferencias en los niveles de monocitos, mientras que aumentó el número de células NKT en comparación a lo observado en tumores al inicio del experimento, posicionándose el PBS significativamente por encima a día 12. De esta forma, los únicos incrementos que puedan correlacionar con el fenotipo observado a la hora de controlar el crecimiento tumoral en los ratones tratados con virus serían: 1) el aumento de linfocitos B a día 8 post-inoculación; y 2) los valores de migración de neutrófilos hacia el tumor en los animales tratados con virus, en este caso, a día 4 post-inoculación los valores de todos los grupos de mantienen al nivel de los valores de neutrófilos en tumores a día 0, pero a días 8 y 12 los animales tratados con virus muestran un flujo positivo de neutrófilos hacia el tumor estadísticamente significativo respecto a los animales tratados con PBS que siguen mostrando valores por debajo de los registrados a día 0, de hecho, a día 12 el número de neutrófilos/mm³ en tumores tratados con WR-Δ3-Luc aumenta significativamente respecto al grupo tratado con WR wt. Asimismo, al analizar los valores de los marcadores CD69 y PD-1, se observó que los linfocitos T CD4 (principalmente) y CD8 en los grupos tratados con virus muestran niveles superiores de PD-1; mientras que los resultados obtenidos para CD69 señalan a los linfocitos T CD8 de animales tratados con PBS como los que presentan mayor expresión a días 4 y 8 post-inoculación.

4.9.4. Análisis de la respuesta inmune específica inducida en un contexto de infección en tumores de células B16F10.

Uno de los factores a tener en cuenta a la hora de considerar los tratamientos oncolíticos frente a tumores, es la capacidad que estos presentan a la hora de involucrar al sistema inmune del hospedador en la inducción de una respuesta inmune específica frente al tumor, resaltando así el valor añadido que dichas terapias pueden proporcionar en un escenario en el que se produzca metástasis o frente a un tumor recurrente. Por este motivo se decidió analizar si el candidato oncolítico WR-Δ3-Luc presentaba *in vivo* alguna ventaja frente al virus salvaje WR respecto a la inducción de una respuesta inmune específica. Para llevar a cabo el experimento se seleccionaron los ratones sacrificados a día 12 post-infección, dado que 12 días son suficientes para que se haya generado una respuesta inmune adaptativa primaria y se determinó, *in bazo*, mediante ELISpot el número de células secretoras de IFN γ frente a los péptidos de melanoma

gp100 y TRP-2, y frente al péptido de la proteína viral B8 siguiendo la metodología descrita en el apartado 3.3.4.1.

Tal y como se puede observar en la **Figura 37.A**, se detecta una respuesta específica de esplenocitos que secretan IFN γ frente al péptido gp100₂₅₋₃₃ en los animales tratados con el virus WR- Δ 3-Luc (promedio de 35 puntos de IFN γ por cada millón de esplenocitos), siendo dicha respuesta significativamente superior a la obtenida en los ratones tratados con el virus salvaje WR y en los ratones tratados con PBS ($p < 0,01$). De la misma forma, cuando se analiza la respuesta frente al péptido TRP-2₁₈₀₋₁₈₈ (**Figura 37.B**), el grupo tratado con el virus mutante de delección WR- Δ 3-Luc muestra una respuesta específica (promedio de 30 puntos de IFN γ por cada millón de esplenocitos) significativamente superior en comparación con los grupos tratados con WR wt y PBS (que presentan respuestas despreciables) ($p < 0,01$).

Asimismo, y para determinar la respuesta específica inducida frente al vector en los animales tratados, se llevó a cabo la estimulación de los esplenocitos con el péptido de vaccinia B8R₂₀₋₂₇ (**Figura 37.C**). Como puede observarse, los animales tratados con el virus salvaje WR muestran los valores de respuesta específica más altos, mientras que los animales tratados con el virus WR- Δ 3-Luc muestran una respuesta específica más baja. Los animales con PBS no muestran ninguna respuesta.

Los resultados muestran que los animales tratados con WR wt o WR- Δ 3-Luc, presentan una respuesta específica frente al virus vaccinia. Sin embargo, únicamente los animales tratados con WR- Δ 3-Luc son capaces de romper la inmuno-tolerancia frente a los antígenos presentes en las células de melanoma B16F10 (gp100 y TRP-2), mostrando valores de respuesta muy pobres en los animales tratados con PBS y en los animales tratados con WR wt (a pesar de que éste grupo presenta los valores de respuesta específica frente al vector más altos). Lo más destacable, es que se ha conseguido detectar respuesta inmune específica frente a antígenos asociados a tumor después de la administración intratumoral de una sola dosis del virus candidato oncolítico WR- Δ 3-Luc.

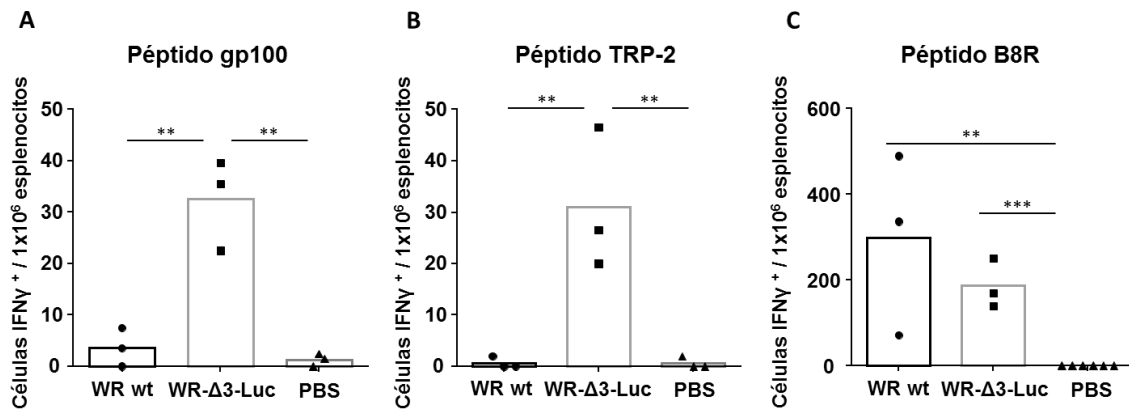


Figura 37. ELISpot de IFN γ para el análisis de la respuesta inmune adaptativa en ratones con tumores de B16F10 tratados con virus. Se analizó la respuesta específica frente a los péptidos gp100₂₅₋₃₃ (A), TRP-2₁₈₀₋₁₈₈ (B) o B8R₂₀₋₂₇ (C) en células de bazo en el punto de 12 días tras la administración de los inóculos. Las muestras se analizaron individualmente, presentando por duplicado los valores de cada una de las muestras obtenidas de cada ratón. Las respuestas obtenidas se han calculado sustrayendo los valores de RPMI de cada condición, y se presentan como células IFN γ ⁺ por cada millón de esplenocitos. El análisis estadístico se ha llevado a cabo empleando la prueba ANOVA: **, $p < 0,01$; ***, $p < 0,005$.

5. Discusión

La terapia con virus oncolíticos se viene posicionando desde la última década como una sólida opción entre los tratamientos disponibles frente a tumores, habiendo conseguido situar a varios candidatos en la línea de vanguardia: IMLYGIC[®] (talimogene laherparepvec), el primer virus oncolítico basado en un virus herpes simplex aprobado por la FDA para su uso en humanos; H101[®] (Oncorine), adenovirus recombinante aprobado para su uso en China; Pexa-Vec[®] (JX-594), vector oncolítico basado en el virus vaccinia actualmente en ensayos clínicos en fase III (identificador ClinicalTrials.gov: NCT02562755); GL-ONC1 (GLV-1h68), otro vector oncolítico basado en el virus vaccinia con ensayo clínico en fase II completado (identificador ClinicalTrials.gov: NCT01443260); o pelareorep (Reolysin[®]), terapia basada en un reovirus con un ensayo clínico en fase III completado (identificador ClinicalTrials.gov: NCT01166542) y actualmente en ensayos clínicos en marcha en fase I y II en combinación con quimioterapia (identificadores ClinicalTrials.gov: NCT01274624, NCT02723838, NCT01656538).

En este sentido, y con el objetivo de continuar desarrollando e implementando el campo de la viro-terapia basada en poxvirus, se están empleando una amplia variedad de estrategias como son: la inducción de respuesta inmune específica (inmuno-terapia) mediante la co-expresión de AAT (Amato *et al.*, 2008; Choi & Chang, 2013; de Vries *et al.*, 2015), el empleo de genes suicidas (Chalikonda *et al.*, 2008; Foloppe *et al.*, 2008; Husseini *et al.*, 2016), la expresión de genes utilizados para la visualización de los tumores como herramienta de diagnóstico (Jun *et al.*, 2014) o la expresión de genes inmuno-moduladores (moléculas co-activadoras o citoquinas) (Adamina *et al.*, 2010; Wang *et al.*, 2012; Zajac *et al.*, 1998).

Con estos antecedentes y considerando las ventajas que un virus recombinante basado en el virus vaccinia presenta en un contexto tumoral, se decidió generar un conjunto de virus mutantes de delección basados en la cepa WR del virus vaccinia. La estrategia, diseñada para la atenuación de los virus en un contexto somático y su comportamiento normal en un contexto tumoral, se basó en la combinación de delecciones de genes involucrados en el metabolismo de nucleótidos – timidilato quinasa y timidina quinasa – (*A48R* y *J2R*, respectivamente), de un factor mitogénico – VGF – (*C11R*), de un gen que participa en la inhibición de la respuesta mediada por interferón tipo I (*B18R*), de un

gen involucrado en la inhibición de la apoptosis (*FIL*) y de un gen implicado en la inducción de hipoxia (*C16L*). De esta forma, las deleciones se dirigieron hacia aquellos genes que pueden ser prescindibles para un comportamiento normal del virus en tumor, dadas las condiciones particulares de su micro-ambiente (como son la elevada proliferación celular, el contexto inmuno-regulado, el bajo perfil apoptótico, o las condiciones naturales de hipoxia en ciertas regiones del tumor), pero que, en cambio, son necesarios en células de tejidos sanos. En la literatura se pueden encontrar virus que presentan la deleción de algunos de los genes antes mencionados individualmente o como combinación de los mismos, utilizados como agentes oncolíticos: vvDD (cepa WR con deleciones en los genes *J2R* y *C11R* (McCart *et al.*, 2001)), JX-594 (cepa Wyeth con deleción en el gen *J2R* y expresando GM-CSF humano (Kim *et al.*, 2006)), WR-ΔB18R (Kirn *et al.*, 2007), o JX-795 (cepa WR con deleciones en los genes *J2R* y *B18R* con o sin la expresión de IFN-β (Kirn *et al.*, 2007)). En la estrategia propuesta en este trabajo se plantean, como novedosas, la deleción conjunta de los genes *B18R*, *C11R* y *A48R* (gen cuya deleción no se ha probado previamente sobre un virus candidato oncolítico), y las combinaciones con los genes *J2R*, *FIL* y *C16L* (de estos dos últimos tampoco se ha probado previamente su potencial uso en terapia frente a tumores), buscando que la combinación de deleciones en un mismo virus den como resultado un equilibrio seguridad/efectividad para conseguir un candidato que pueda competir al nivel del resto de propuestas actuales a nivel pre-clínico.

Para ello, en primer lugar, se generaron los siguientes virus mutantes de deleción: WR-Δ3 (con deleción en los genes *A48R*, *B18R* y *C11R*), WR-Δ3-Luc y WR-Δ3-GFP (con los genes de la luciferasa o GFP insertados en lugar del gen *J2R*), WR-Δ3-ΔF1L (con la deleción adicional del gen *FIL*), y WR-Δ3-ΔC16L (con la deleción adicional del gen *C16L*).

Una vez generados, el siguiente paso fue evaluar la capacidad de replicación de los distintos candidatos frente a la mostrada por el virus parental salvaje WR, ya que es fundamental mantener la naturaleza replicativa de los virus generados, con el fin de que no se vean afectadas las mismas cualidades que hacen del virus vaccinia un virus apto para su uso en terapia oncolítica. Se observó que todos los virus recombinantes generados, aunque con diferencias puntuales, presentaban el mismo perfil de replicación que el mostrado por el virus WR wt en todas las líneas celulares analizadas. Sin embargo, el perfil que la cepa WR de vaccinia muestra en células de melanoma B16F10

se diferencia del mostrado en el resto de las líneas celulares, alcanzando títulos máximos de 10^6 ufp/ml a 32 hpi; lo que sugiere una mayor capacidad citolítica en estas células. Igualmente, cuando se evaluó el tamaño de placa de los mutantes de delección no se apreciaron diferencias significativas entre los virus candidatos y el virus salvaje WR. Asimismo, cuando se analizó la producción de proteína viral total y la capacidad de inducir apoptosis, todos los virus mostraron el mismo comportamiento que el virus parental, excepto por la inducción de apoptosis que se mostraba controlada en todos los casos salvo en las muestras infectadas con el virus WR- $\Delta 3$ - $\Delta F1L$, que mostraban un aumento significativo acorde con la delección llevada a cabo.

De esta forma, se ha podido comprobar que las delecciones llevadas a cabo en los virus generados no afectan a su capacidad infectiva y replicativa *in vitro*.

A pesar de la alta eficiencia en la infección y lisis de células tumorales en monocapas en cultivo, no se tiene mucho conocimiento del comportamiento que presentan los virus en tumores sólidos en 3 dimensiones, respecto a su capacidad de infectar y lisar las células tumorales, y la dispersión de los viriones resultantes de la infección. Por este motivo, y como prueba de concepto, se generaron esferoides de células de cáncer de próstata TRAMP-C1 en cultivo y se observó que tanto los esferoides infectados con el virus salvaje, como los infectados con el virus mutante de delección WR- $\Delta 3$ -Luc (sin detectar ninguna diferencia entre los vectores virales), se muestran disgregados en las zonas más expuestas a la infección, lo que indirectamente muestra la efectividad de los virus a la hora de infectar y lisar tumores en 3 dimensiones; además, muestra un patrón difuso en las zonas más desestructuradas - ambas, características claves en un contexto tumoral *in vivo* (Wein *et al.*, 2003)-.

De esta forma, se han generado una serie de virus mutantes de delección que cumplen los requisitos de la primera fase de la estrategia, exhibiendo las mismas características replicativas y de comportamiento *in vitro* que su parental WR wt, y que además presentan correctamente las delecciones múltiples de los genes virales seleccionados, que se muestran como no esenciales para el crecimiento del virus en células en cultivo.

Puesto que el objetivo final de estos virus es su uso en terapia, es crucial examinar la virulencia de los mismos. Para ello, el siguiente punto a considerar fue el perfil de seguridad de los virus. En los ensayos de pérdida de peso, los virus generados se compararon con el virus salvaje WR que presenta un DL_{50} de 5×10^5 ufp/ratón por vía

intranasal. Lo que se pudo concluir fue que, de los mutantes de delección generados el virus WR- $\Delta 3$ alcanzó su valor de DL_{50} con la dosis de 5×10^7 ufp/ratón; sin embargo, para los mutantes de delección WR- $\Delta 3$ - $\Delta F1L$ y WR- $\Delta 3$ - $\Delta C16L$ esta dosis resultó letal en todos los casos. Contrariamente a lo observado, en la literatura se ha descrito que la delección de estos dos genes por separado está directamente relacionada con una disminución de la virulencia de los vectores virales (Fahy *et al.*, 2008; Gerlic *et al.*, 2013). Aunque en el presente trabajo, el aumento de la inducción de apoptosis en el caso del virus WR- $\Delta 3$ - $\Delta F1L$ (que puede estar en relación con la disminución de supervivencia de los ratones inoculados, dada la temprana respuesta inflamatoria que muestra el mutante de delección $\Delta F1L$ (Gerlic *et al.*, 2013) junto a la posible contribución de la delección del resto de los genes), o el papel de C16 como factor de virulencia (que puede encontrar relación la menor supervivencia de los animales, dado el hecho de que su delección induce niveles de citoquinas y quimioquinas superiores a los del virus parental a tiempos tempranos (Peters *et al.*, 2013), junto con el efecto conjunto del resto de genes delecionados) pueden explicar que estos virus presenten un comportamiento *in vivo* más agresivo que su parental WR- $\Delta 3$. A diferencia de los perfiles de seguridad observados, el virus WR- $\Delta 3$ -Luc muestra un 100% de supervivencia a la mayor dosis empleada, donde ninguno de los ratones experimentó pérdida de peso ni mostró signos de enfermedad. Los resultados observados muestran por tanto que la delección adicional del gen *J2R* (cuya delección ya había sido asociada con una disminución de la patogenicidad del virus (Buller *et al.*, 1985; Rodríguez *et al.*, 1989)) a los genes ya delecionados (*A48R*, *B18R* y *C11R*) en el WR- $\Delta 3$ -Luc mejora significativamente la seguridad mostrada por el virus salvaje WR, por su parental WR- $\Delta 3$ y por el resto de los candidatos generados. Así, el fenotipo de seguridad mostrado por el virus WR- $\Delta 3$ -Luc es resultado de la combinación concreta de sus delecciones, estando de acuerdo con la asociación descrita de la delección conjunta de los genes *A48R* y *J2R* con un perfil de atenuación aumentado (Hughes *et al.*, 1991), y teniendo en cuenta que la dosis de 5×10^6 ufp/ratón sigue siendo dosis letal en los ratones tratados con WR-Luc (con el gen *J2R* delecionado) o con WR wt.

De la misma forma, el perfil de seguridad del virus WR- $\Delta 3$ -Luc es consistente con los resultados obtenidos en los ensayos de biodistribución, donde los títulos de virus para WR- $\Delta 3$ -Luc fueron significativamente inferiores en ovario (un órgano diana del virus vaccinia) y en lavados peritoneales (llegando a no detectarse a 120 hpi), e indetectables

en cerebro. Por lo tanto, el virus candidato WR- Δ 3-Luc muestra una mayor seguridad *in vivo* a la vez que una replicación reducida en tejidos somáticos; reduciendo también el impacto sobre el cerebro de la cepa WR caracterizada por presentar neuro-tropismo (Tschannen & Schafer, 1980; Tschannen *et al.*, 1979).

Así, se ha conseguido, mediante la combinación de las deleciones realizadas en el virus WR- Δ 3-Luc, obtener un virus que presenta un comportamiento muy similar al virus WR wt *in vitro*, pero que proporciona un fenotipo de seguridad aumentado *in vivo* cuando se evalúa su comportamiento en un contexto somático en tejidos sanos. De esta manera, a pesar del amplio tropismo del virus vaccinia, las deleciones llevadas a cabo se traducen en una mayor seguridad por disminuir la virulencia del virus en tejidos no tumorales, consiguiéndose cumplir el primero de los requisitos necesarios en la generación de un virus oncolítico basado en vaccinia.

La respuesta inmune innata constituye una de las primeras líneas de defensa frente a infecciones virales, aunque el tipo de respuesta inducida es dependiente del tipo del agente infeccioso. El virus vaccinia presenta un conjunto de proteínas inmuno-moduladoras que actúan a nivel de las cascadas de señalización involucradas en la respuesta innata y como inhibidores extracelulares, de forma que modulan el cóctel de citoquinas y quimioquinas responsables del tipo de respuesta inducida (Johnston & McFadden, 2003; McFADDEN, 2005b). Así, el perfil de migración de poblaciones celulares de respuesta innata no solo afecta a la respuesta frente a la infección por el virus vaccinia, sino que también influye en la respuesta que se induzca en el microambiente tumoral, y por tanto en la respuesta por parte del sistema inmune frente al tumor. Así, cuando se analizó la migración de células del sistema inmune en la cavidad peritoneal con el objetivo de estudiar la respuesta innata en el contexto de la infección viral, se observó que, desde el tiempo más temprano, los mutantes de deleción generados inducían niveles de migración hacia el sitio de la infección similares o superiores a los mostrados por los animales inoculados con el virus salvaje WR; de hecho, este escenario se mantiene tras la inoculación de los virus, hasta las 12 hpi. El virus WR- Δ 3- Δ F1L destacó con valores de número de células reclutadas superiores al resto de virus analizados a las 3 hpi; este hecho puede estar relacionado con la deleción del gen *F1L*, dado que la inducción de apoptosis durante la infección puede acelerar el proceso de migración que muestran el resto de los virus a tiempos más tardíos. De la misma forma, el virus WR- Δ 3-Luc fue el que mostró los valores de migración más altos

mantenidos a lo largo de todo el experimento. Dos de las poblaciones especialmente llamativas son: los macrófagos, que desde las 3 hpi mostraban una disminución significativa en los animales infectados; y los neutrófilos, que fueron la población celular que mayor aumento mostró en todos los puntos de la cinética. Así, los virus mutantes de delección que se han generado muestran un perfil de migración al sitio de la infección (sin atender al fenotipo de activación o subtipos celulares) en el que aumentan (neutrófilos) o mantienen las poblaciones celulares al nivel del virus salvaje WR (monocitos, células NK, células NKT, células dendríticas, y linfocitos T CD4 y CD8) y por encima de los valores observados en ratones inyectados con PBS. Las poblaciones celulares estudiadas que aumentan o mantienen los mismos niveles del virus salvaje después de llevar a cabo las delecciones, se presentan como claves a la hora de inducir una respuesta efectiva anti-tumoral por parte del sistema inmune (Gajewski *et al.*, 2013; Liu & Zeng, 2012; Woo *et al.*, 2015); destacando de forma significativa los neutrófilos en el uso del virus vaccinia dirigido hacia el tratamiento tumoral (Di Pilato *et al.*, 2015a; Duffy *et al.*, 2012; Parviainen *et al.*, 2015).

En cuanto a la eficacia de los vectores, en los experimentos preliminares llevados a cabo con el modelo singénico de trasplante de células de melanoma B16F10, los animales tratados con los virus mutantes de delección mostraron una capacidad similar de controlar el crecimiento tumoral, que se presentaba como significativamente superior al grupo control (PBS) tras la administración de una única dosis de virus. Este hecho se observa en el perfil de incremento tumoral y en los valores observados tras calcular las áreas bajo la curva de evolución de los tumores, donde los ratones tratados con PBS alcanzaron el volumen de tumor de sacrificio antes de los doce días post-inoculación.

El proceso de diseño de un vector viral para su uso como agente oncolítico atiende a dos características clave: por una parte la efectividad que presenta el virus a la hora de actuar frente a un contexto tumoral y por otra parte la seguridad de uso del mismo *in vivo* (dado que se trata de un vector replicativo). Así, de entre los distintos vectores candidatos que se probaron, finalmente se seleccionó el virus mutante de delección WR- Δ 3-Luc, atendiendo a las siguientes características: mantiene la misma capacidad de replicación *in vitro* que el virus salvaje WR, presenta el perfil de control del incremento del volumen tumoral más estable a lo largo del experimento y muestra un perfil de seguridad mucho mayor que el observado en el resto de los virus. Este perfil se caracteriza por los títulos de virus más bajos observados en ovario y lavados

peritoneales tras una inoculación sistémica, y por los valores de migración de células de respuesta innata al sitio de infección superiores o iguales a los mostrados por el virus salvaje WR. De esta forma, la combinación de las 4 deleciones llevadas a cabo sobre el virus WR- Δ 3-Luc (pudiendo desvincular el papel de la expresión del gen reportero luciferasa sobre los efectos observados, según se ha reportado previamente (Tiffen *et al.*, 2010)), no sólo ha respondido a su propósito haciendo al vector menos virulento y más seguro en tejidos normales, sino que ha mantenido y/o mejorado las cualidades antitumorales del virus salvaje WR.

De la misma forma, a pesar de que los virus mutantes WR- Δ 3 y WR- Δ 3- Δ F1L presentan un comportamiento frente al control del crecimiento tumoral similar al observado con el virus WR- Δ 3-Luc, estas combinaciones de deleciones no dan como resultado el mismo grado en la reducción de la virulencia respecto al obtenido con la deleción adicional del gen *J2R* sobre el genoma de WR- Δ 3. Este hecho se traduce en la pérdida de uno de los requisitos para la estrategia planteada en este trabajo: la seguridad en el uso del virus en tejidos sanos. Asimismo, y a la espera de realizar los ensayos *in vivo* para determinar el grado de control tumoral, el virus WR- Δ 3- Δ C16L presenta el mismo problema que el resto de los virus analizados, su virulencia es mayor respecto al virus candidato WR- Δ 3-Luc. De esta forma, el virus WR- Δ 3-Luc, se presenta por encima del resto de los candidatos evaluados en cuanto a los requerimientos para la implementación de un vector oncolítico eficiente y seguro.

Mediante un análisis más exhaustivo del comportamiento y de los efectos del tratamiento con el virus WR- Δ 3-Luc sobre tumores de B16F10, se ha comprobado nuevamente que tras una dosis, el virus mutante de deleción es más efectivo en el control del crecimiento tumoral que el virus salvaje WR; además se ha conseguido la completa eliminación de los tumores en 3 ratones. También se ha demostrado que parte de los efectos sobre el control tumoral son debidos a la replicación del virus en el tumor, mostrando títulos virales semejantes a los obtenidos en tumores tratados con WR wt. En este sentido adquieren especial relevancia los datos obtenidos en el ensayo de biodistribución, donde los animales inoculados con el virus WR- Δ 3-Luc mostraban menor título viral en ovarios y no se pudo detectar presencia viral en exudados peritoneales (a diferencia de lo observado con los otros virus) 5 días después de la infección, mientras que en tumores de animales tratados con el virus WR- Δ 3-Luc se pueden observar altos títulos virales 12 días después de su administración. Estos datos

muestran la seguridad del virus WR-Δ3-Luc en un contexto somático y su capacidad como virus oncolítico, con títulos al nivel del virus salvaje WR, en un contexto tumoral.

Otro de los factores a destacar es la migración de células implicadas en respuesta inmune innata en tumores tratados con la cepa WR del virus vaccinia. Los tumores tratados con el virus WR-Δ3-Luc muestran un incremento significativo del número de neutrófilos ($p < 0,005$) respecto a los tumores no tratados, así como un incremento de linfocitos B, coincidiendo este fenotipo con la mayor capacidad de controlar el crecimiento de las células tumorales trasplantadas. Sin embargo, no se observó en tumores un aumento en la infiltración de células NK, NKT o linfocitos T CD4 y CD8, tal y como se había observado en los valores de migración al peritoneo; esto deja la contribución anti-tumoral del sistema inmune en nuestro modelo en un balance de poblaciones de respuesta innata entre los que destacan significativamente los neutrófilos y los linfocitos B, centrándose únicamente en los tipos celulares, sin atender al perfil de activación o marcadores de subtipos celulares. En esta misma dirección, también se observó en los bazo de ratones tratados con virus un incremento en el número de linfocitos T CD4 y CD8 significativamente superior a los ratones tratados con PBS.

Los neutrófilos son una pieza clave frente a las infecciones, formando parte de la primera línea de defensa y siendo de las primeras células en llegar al sitio de infección (Borregaard, 2010). Éstos desempeñan un papel importante frente a la infección por el virus vaccinia (Duffy *et al.*, 2012), pueden adquirir un fenotipo de células presentadoras que ayudan a la inducción de una respuesta inmune específica (Di Pilato *et al.*, 2015a) y se los ha relacionado como uno de los factores que intervienen en el éxito de la oncolisis mediada por el virus vaccinia (Gentschev *et al.*, 2012; Parviainen *et al.*, 2015). En el contexto tumoral, se presentan como elementos divalentes, de forma que se ha sugerido que los neutrófilos asociados a tumor (NAT) se pueden encontrar como subconjuntos N1 y N2 (Fridlender *et al.*, 2009): elementos inmuno-reguladores que actúan como pro-tumorigénicos para mantener el microambiente tumoral (subtipo N2) (Hattar *et al.*, 2014; Jablonska *et al.*, 2010; Mishalian *et al.*, 2013); o elementos cuya presencia indica una prognosis favorable dado su fenotipo de bajos niveles de arginasa y la producción de citoquinas y quimioquinas que favorecen la respuesta frente a tumores (subtipo N1) (Fridlender & Albelda, 2012; Fridlender *et al.*, 2009). En el modelo de estudio empleado, se puede observar en los grupos de ratones tratados con virus una relación entre el fenotipo de mayor control del crecimiento tumoral y un aumento en el número

de neutrófilos infiltrados en el tumor; esto lleva a plantearse que el papel que puedan estar desempeñando los neutrófilos en la terapia oncolítica basada en la cepa WR de vaccinia pueda estar relacionado con su función anti-tumorigénica, tal y como se ha podido observar previamente en el modelo de B16F10 con neutrófilos estimulados por virus (Chang *et al.*, 2016), actuando de forma sinérgica con la oncolisis viral.

Al igual que los neutrófilos, el aumento de linfocitos B en tumores B16F10 ha sido identificado como un elemento que contribuye a generar una respuesta anti-tumoral efectiva, sugiriéndose su relación con el aumento de linfocitos T activos infiltrados en tumor (Kobayashi *et al.*, 2014). Así, el aumento observado del número de linfocitos B que migran a tumores de animales tratados con el virus WR- Δ 3-Luc, podría presentarse como uno de los factores en la regulación positiva del sistema inmune frente a los tumores en nuestro modelo.

Asimismo, aunque se ha observado que los valores de linfocitos T CD4 y CD8 infiltrados en tumor se mantienen al nivel de los obtenidos en el grupo PBS y no varían significativamente con respecto a los valores observados al comienzo del experimento, los valores significativamente mayores de linfocitos T CD4 y CD8 observados en bazo pueden indicar que este aumento de linfocitos sea el resultado de la migración de células del sistema inmune (como células dendríticas o macrófagos) desde el tumor hasta el principal órgano del sistema linfático, y que éste pueda estar relacionado con la repuesta adaptativa inducida frente al tumor.

En cuanto a los marcadores de linfocitos T, se analizaron CD69 y PD-1. Respecto a los valores observados para CD69, los linfocitos CD8 de ratones tratados con virus mostraron niveles significativamente por debajo de los obtenidos en los ratones tratados con PBS mientras que los linfocitos CD4 mantuvieron los niveles hasta 8 días después de la administración del inóculo. En cuanto a los valores de PD-1, tanto para los linfocitos T CD4 como CD8, estos fueron significativamente superiores en los ratones tratados con virus hasta el día 8 post-inoculación. Respecto a estos marcadores, la expresión de CD69 se ha relacionado con la expresión de TGF- β (Esplugues *et al.*, 2003), que a su vez inhibe la proliferación, diferenciación y respuestas de las células T citotóxicas (Gorelik & Flavell, 2000; Kehrl *et al.*, 1986); asimismo, se ha demostrado una relación directa del papel represor del efecto anti-tumoral de CD69 en animales en los que una deficiencia en la expresión de CD69 producía un aumento en la respuesta

anti-tumoral (Esplugues *et al.*, 2003). De esta forma, el hecho de que los animales que muestran un mejor control del crecimiento tumoral sean los que muestran valores más bajos de CD69 puede ser un indicativo de que el tratamiento con virus es capaz de inducir una respuesta celular anti-tumoral más efectiva.

Por otra parte, la expresión de PD-1 está generalmente asociada a un fenotipo de células T exhaustas (Barber *et al.*, 2006). Sin embargo, recientemente se han descrito en linfoma folicular 2 poblaciones de linfocitos T CD4 infiltrados que muestran que los pacientes con mayor proporción de CD4⁺PD-1^{BAJO} están asociados con una prognosis pobre y una supervivencia reducida, mientras que los que muestran una mayor proporción de CD4⁺PD-1^{ALTO} no muestran esta tendencia (Yang *et al.*, 2015). Así, este fenotipo de células T CD4⁺PD-1^{ALTO} es consistente con los datos de linfocitos infiltrados en los tumores de ratones tratados con los virus WR wt o WR-Δ3-Luc que consiguen controlar durante más tiempo la proliferación tumoral.

Teniendo en cuenta la información de que se dispone en la literatura y los resultados preliminares obtenidos en los estudios de oncolisis *in vivo*, se debe indagar más sobre este tema en el modelo de estudio presentado en este trabajo, abordándolo con un análisis más detallado de marcadores de activación/represión y subpoblaciones celulares que puedan estar modulando la respuesta en el contexto del tumor.

Uno de los pilares fundamentales en el contexto tumoral, y por tanto una de las bases de su capacidad para evadir al sistema inmune, es el escenario de inmuno-tolerancia que se establece en los tumores; los antígenos que se presentan sobre-expresados en tumores están también presentes (aunque sea a niveles mínimos) en tejidos sanos del organismo, con lo que se produce una tolerancia inmunológica para evitar respuestas autoinmunes. De esta forma, la respuesta inmune específica frente a antígenos asociados a tumor se encuentra, en condiciones normales, restringida a interacciones de baja avidéz que limitan la eficacia terapéutica del sistema inmune frente a tumores; por este motivo la inducción de una respuesta adaptativa específica frente a AAT adquiere una importancia clave en el desarrollo de terapias antitumorales (Bos *et al.*, 2012; Gajewski *et al.*, 2013; Makkouk & Weiner, 2015). De esta forma, cuando se analizó la capacidad de inducir respuesta inmune adaptativa específica frente a los antígenos de melanoma gp100 y TRP-2 (AAT presentes en las células B16F10 trasplantadas), se observó que únicamente en los bazo de animales tratados con el virus WR-Δ3-Luc se detectaban

linfocitos específicos productores de IFN γ , y que éstos presentaban una menor repuesta frente al virus que la observada en los bazo de animales tratados con el virus WR wt. Así, y teniendo en cuenta que la fuente de estos AAT (gp100 y TRP-2) es exclusivamente el resultado de la lisis de células tumorales, la diferencia significativa en los resultados obtenidos de respuesta inmune específica en bazo entre los virus WR wt y WR- Δ 3-Luc, puede estar influenciada por el perfil concreto de reclutamiento que presentan los animales tratados con WR- Δ 3-Luc. Esto refuerza las características presentadas por el virus WR- Δ 3-Luc, el cual muestra una alta eficacia en el control del crecimiento de los tumores de células B16F10, contexto en el que ha demostrado que actúan de forma sinérgica su capacidad replicativa y oncolítica *in vivo* (al nivel del virus WR wt), así como su capacidad para estimular no sólo respuesta inmune innata, sino también respuesta inmune adaptativa específica frente a AAT que podría estar participando en el control tumoral observado.

En conjunto, el virus oncolítico generado WR- Δ 3-Luc cumple con los requerimientos que definen la oncolisis viral en el contexto del virus vaccinia: 1) las deleciones propuestas han mostrado no tener un efecto significativo sobre el crecimiento normal del virus *in vitro*; 2) ha mostrado *in vivo* una reducción de la virulencia y la patogenicidad en comparación con el virus salvaje WR, lo que subraya el aumento de la seguridad del vector en un contexto no tumoral en tejidos sanos, ayudando así a reducir los problemas que un vector replicativo con amplio tropismo podría ocasionar; y 3) la combinación de deleciones en el virus WR- Δ 3-Luc han demostrado una eficacia superior en el control del crecimiento tumoral, mostrando una replicación viral en el tumor muy superior y más prolongada a la observada en tejidos sanos, y un perfil de reclutamiento de células de respuesta innata y adaptativa que lleva asociada la inducción de respuesta específica frente a AAT (**Figura 38**). Como puede observarse, adquiere así especial importancia el equilibrio seguridad/oncolisis conseguido con la combinación de las cuatro deleciones implementadas en este trabajo (**Tabla 6**).

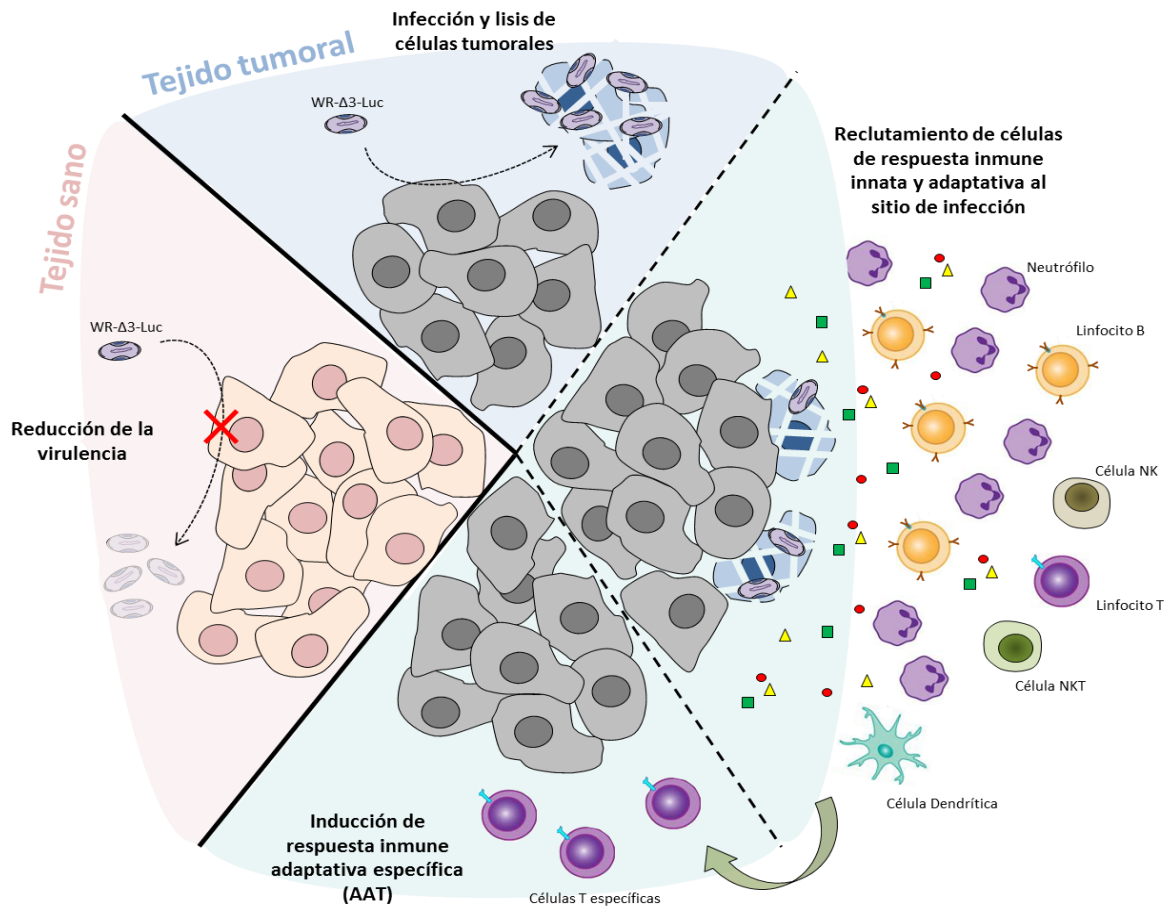


Figura 38. Hipótesis sobre el modo de acción y características del virus oncolítico WR- Δ 3-Luc.

Virus	Características <i>in vitro</i>			Características <i>in vivo</i>									
	Replicación	Traducción de proteínas virales	Inhibición de apoptosis	Dosis letal (i.n.) (u/p/ratón)	Replicación			Reclutamiento al sitio de infección		Control tumoral	Replicación en tumor	Inducción de respuesta específica frente a AAT	Inducción de respuesta específica frente a virus
WR wt	normal	normal	sí	5x10 ⁶	++++	++++	+/-	N + M ++ NK ++ NKT + T CD4 ++ T CD8 ++	N ++ B ++	++	++++	no	++++
WR-Δ3-Luc	normal	normal	sí	>5x10 ⁷	++	+	-	N +++ M ++ NK ++ NKT + T CD4 ++ T CD8 ++	N +++ B ++	++++	++++	sí	+++

Tabla 6. Resumen de las características del virus mutante de delección WR-Δ3-Luc frente al virus salvaje WR wt. Poblaciones celulares: Neutrófilos (N), Monocitos (M), células NK (NK), células NKT (NKT), linfocitos T CD4 (T CD4), linfocitos T CD8 (T CD8) y linfocitos B (B). Vías de inoculación: intranasal (i.n.), intraperitoneal (i.p.) e intratumoral (i.t.).

Perspectivas futuras

De la misma forma, habiendo seleccionado un candidato sólido, los futuros experimentos que podrían derivarse del presente trabajo se engloban en 2 vertientes bien diferenciadas: 1) caracterización del mecanismo subyacente a la eficacia demostrada por el virus oncolítico WR- Δ 3-Luc; y 2) optimización del vector y de la estrategia de vacunación para conseguir un candidato más competitivo.

1) En el proceso de caracterización del virus en el contexto de tumor trasplantado de células B16F10, surgen muchas preguntas en torno a las bases de la eficacia obtenida con el virus. Para intentar contestarlas, se plantean una serie de ensayos como continuación del trabajo presentado:

- Por una parte se podría realizar el seguimiento del virus *in vivo* (haciendo uso del gen reportero de la luciferasa) para poder visualizar en los ratones con tumor la infección del virus, el tiempo que permanece el virus replicando en tumor y el impacto que tiene la infección en tejidos sanos del animal sin necesidad de sacrificarlos (empleándose diversas vías de inoculación del virus).
- También resultaría interesante realizar una cinética en tumores, fijándolos para evaluar los cortes mediante inmunohistoquímica y poder así establecer su comportamiento *in situ* y las regiones tumorales hacia las que muestra preferencia la replicación viral, así como la infiltración de células del sistema inmune y su distribución en el tumor a lo largo del tiempo tras el tratamiento del mismo.
- Por otra parte, se podría profundizar en la implicación que tienen los neutrófilos en el contexto de la infección en tumor, pudiendo depleccionarlos previamente y analizar la evolución tumoral. Asimismo, se podría estudiar el fenotipo de activación de las células infiltradas en tumores infectados y su capacidad de inducir respuesta adaptativa específica. En esta dirección, y con el propósito de indagar sobre las bases que diferencian los tratamientos con los virus WR- Δ 3-Luc o WR wt, también se podría plantear el análisis de las citoquinas y quimioquinas inducidas *in vivo* en la infección del virus (en contexto tumoral y no-tumoral). En estos estudios, el análisis de la contribución de cada uno de los genes delecionados por separado, sería de gran utilidad a la hora de elucidar las distintas implicaciones que cada gen puede estar presentando.

- Igualmente, sería interesante estudiar el efecto que tendría la administración del virus oncolítico WR- Δ 3-Luc en tumores de mayor tamaño (volúmenes en torno a 800-1000 mm³), con el objetivo de determinar el control del volumen tumoral mediado por la oncolisis viral.
- En esta misma dirección, se podría caracterizar con mayor detalle la seguridad del virus mutante de delección en modelos inmuno-comprometidos y calcular su DL₅₀.
- Finalmente, se plantea como pregunta inmediata si los resultados obtenidos en el modelo singénico de trasplante de células de B16F10 pueden ser reproducidos y resultar consistentes en distintos modelos singénicos con células trasplantadas: células de carcinoma de colon (MC38, CMT-93), células de sarcoma murino (24-JK), células de adenocarcinoma de glándula mamaria JC, o células de adenocarcinoma de próstata TRAMP-C1. Del mismo modo también se podrían emplear modelos xenográficos con líneas tumorales humanas, pasando a evaluar la eficacia en el control tumoral en un modelo más cercano al objetivo de esta terapia. Estos experimentos se presentan como necesarios dadas las diferencias en el micro-ambiente tumoral que se pueden encontrar en cada uno de los tipos de tumor y dadas las diferencias que puedan aparecer en el comportamiento del virus WR- Δ 3-Luc dependientes de este mismo micro-ambiente y del tipo celular.

2) La segunda vertiente hacia la que irán dirigidos los experimentos futuros se centra en la optimización del candidato oncolítico seleccionado: WR- Δ 3-Luc.

- Así, el primer paso consistiría en la implementación del protocolo de inmunización a seguir; tras una sola dosis del virus se ha observado una alta eficacia en el control tumoral, con lo que se podría plantear administrar una segunda dosis intratumoral. De forma paralela, se podría evaluar una administración sistémica (intravenosa) del virus.
- Otro punto a considerar, se centraría en la mejora del virus oncolítico *per se*, de forma que pueden introducirse en el virus transgenes inmuno-estimuladores (o combinación de varios) para así potenciar la respuesta inmune innata y adaptativa en el contexto del tumor.

- De la misma forma, poniendo el foco de atención en la generación de una respuesta inmune adaptativa específica, podrían insertarse en el virus secuencias de AAT aprovechando así las características que presenta el virus vaccinia como potente inductor de respuesta celular específica T CD4 y CD8 (Kennedy *et al.*, 2009) y respondiendo a la necesidad inherente de romper la inmuno-tolerancia del sistema inmune frente a los AAT (Makkouk & Weiner, 2015).
- Otra de las opciones que se podrían considerar es la utilización de una terapia combinada, de forma que se haga uso del virus WR-Δ3-Luc junto con alguno de los tratamientos que mejores resultados están mostrando en ensayos pre-clínicos y clínicos: anti-PD1 (Swaika *et al.*, 2015), anti-CTLA4 (Funt *et al.*, 2014) o moléculas co-estimuladoras del sistema inmune.

Asimismo, y de forma paralela, se presenta como una prioridad evaluar la capacidad oncolítica del candidato WR-Δ3-ΔC16L, caracterizado en un contexto no-tumoral, pero del que aún no se ha determinado su eficacia *in vivo* en el tratamiento de tumores.

6. Conclusiones

- 1) Se ha llevado a cabo de forma exitosa la delección de los genes *A48R*, *B18R*, *C11R*, *C16L* y *F1L* en la cepa WR del virus vaccinia, dando lugar a los virus mutantes de delección: WR- Δ 3, WR- Δ 3-Luc, WR- Δ 3- Δ F1L y WR- Δ 3- Δ C16L.
- 2) Las distintas combinaciones de delección de los genes no afectan al comportamiento *in vitro* de los virus generados, mostrando todos ellos capacidades similares al virus WR wt en cuanto a replicación (en líneas celulares primarias, immortalizadas y tumorales) o al tamaño de placa, y en cuanto a producción de proteína viral total.
- 3) Las delecciones de los genes han mostrado una disminución de la virulencia *in vivo* en los virus generados, destacando la combinación de las delecciones en el virus WR- Δ 3-Luc que mejora el perfil de seguridad del virus WR wt y del resto de los candidatos.
- 4) Los virus mutantes de delección generados no ven afectado de forma generalizada el perfil de reclutamiento de células del sistema inmune al sitio de infección mostrado por el virus salvaje en un contexto somático, a excepción de un incremento en la migración de neutrófilos en los virus mutantes de delección.
- 5) Los virus mutantes de delección generados han demostrado su capacidad oncolítica en el modelo murino de trasplante de células tumorales de melanoma B16F10, mostrando un retraso significativo en el desarrollo tumoral tras la administración de una única dosis.
- 6) El virus WR- Δ 3-Luc inoculado intratumoralmente produce un perfil de migración en el que destacan significativamente la infiltración de neutrófilos y linfocitos B en tumor, y la migración de linfocitos T CD4 y CD8 en el bazo.
- 7) La capacidad replicativa en tumores del virus WR- Δ 3-Luc es comparable a la del virus salvaje WR.
- 8) El virus WR- Δ 3-Luc muestra la capacidad de inducir una respuesta inmune específica frente a antígenos asociados a tumor presentes en los tumores tratados.

7. Bibliografía

- Adamina, M., Rosenthal, R., Weber, W. P., Frey, D. M., Viehl, C. T., Bolli, M., Huegli, R. W., Jacob, A. L., Heberer, M., Oertli, D., Marti, W., Spagnoli, G. C. & Zajac, P. (2010). Intranodal immunization with a vaccinia virus encoding multiple antigenic epitopes and costimulatory molecules in metastatic melanoma. *Molecular therapy : the journal of the American Society of Gene Therapy* **18**, 651-659.
- Amato, R. J., Drury, N., Naylor, S., Jac, J., Saxena, S., Cao, A., Hernandez-McClain, J. & Harrop, R. (2008). Vaccination of prostate cancer patients with modified vaccinia ankara delivering the tumor antigen 5T4 (TroVax): a phase 2 trial. *Journal of immunotherapy* **31**, 577-585.
- Andrew A. Mercer, A. S., Olaf Weber (2007). *Poxviruses*.
- Aranda, F., Vacchelli, E., Obrist, F., Eggermont, A., Galon, J., Herve Fridman, W., Cremer, I., Tartour, E., Zitvogel, L., Kroemer, G. & Galluzzi, L. (2014). Trial Watch: Adoptive cell transfer for anticancer immunotherapy. *Oncoimmunology* **3**, e28344.
- Artenstein, A. W. & Grabenstein, J. D. (2008). Smallpox vaccines for biodefense: need and feasibility. *Expert review of vaccines* **7**, 1225-1237.
- Ascierto, P. A., Kirkwood, J. M., Grob, J. J., Simeone, E., Grimaldi, A. M., Maio, M., Palmieri, G., Testori, A., Marincola, F. M. & Mozzillo, N. (2012). The role of BRAF V600 mutation in melanoma. *Journal of translational medicine* **10**, 85.
- B., M. (2007). Poxviridae: The viruses and their replication. In *Fields virology*, pp. 2905–2946. Edited by H. P. Knipe DM: Lippincott Williams & Wilkins.
- Barber, D. L., Wherry, E. J., Masopust, D., Zhu, B., Allison, J. P., Sharpe, A. H., Freeman, G. J. & Ahmed, R. (2006). Restoring function in exhausted CD8 T cells during chronic viral infection. *Nature* **439**, 682-687.
- Bierman, H. R., Crile, D. M., Dod, K. S., Kelly, K. H., Petrakis, N. L., White, L. P. & Shimkin, M. B. (1953). Remissions in leukemia of childhood following acute infectious disease: staphylococcus and streptococcus, varicella, and feline panleukopenia. *Cancer* **6**, 591-605.
- Blasco, R. & Moss, B. (1991). Extracellular vaccinia virus formation and cell-to-cell virus transmission are prevented by deletion of the gene encoding the 37,000-Dalton outer envelope protein. *Journal of virology* **65**, 5910-5920.

- Borregaard, N. (2010).** Neutrophils, from marrow to microbes. *Immunity* **33**, 657-670.
- Bos, R., Marquardt, K. L., Cheung, J. & Sherman, L. A. (2012).** Functional differences between low- and high-affinity CD8(+) T cells in the tumor environment. *Oncoimmunology* **1**, 1239-1247.
- Breitbach, C. J., Paterson, J. M., Lemay, C. G., Falls, T. J., McGuire, A., Parato, K. A., Stojdl, D. F., Daneshmand, M., Speth, K., Kirn, D., McCart, J. A., Atkins, H. & Bell, J. C. (2007).** Targeted inflammation during oncolytic virus therapy severely compromises tumor blood flow. *Molecular therapy : the journal of the American Society of Gene Therapy* **15**, 1686-1693.
- Buller, R. M., Smith, G. L., Cremer, K., Notkins, A. L. & Moss, B. (1985).** Decreased virulence of recombinant vaccinia virus expression vectors is associated with a thymidine kinase-negative phenotype. *Nature* **317**, 813-815.
- Carroll, M. W. & Moss, B. (1995).** E. coli beta-glucuronidase (GUS) as a marker for recombinant vaccinia viruses. *BioTechniques* **19**, 352-354, 356.
- Carter, G. C., Rodger, G., Murphy, B. J., Law, M., Krauss, O., Hollinshead, M. & Smith, G. L. (2003).** Vaccinia virus cores are transported on microtubules. *The Journal of general virology* **84**, 2443-2458.
- Cochran, M. A., Puckett, C. & Moss, B. (1985).** In vitro mutagenesis of the promoter region for a vaccinia virus gene: evidence for tandem early and late regulatory signals. *Journal of virology* **54**, 30-37.
- Cui, Q., Shin, W. S., Luo, Y., Tian, J., Cui, H. & Yin, D. (2013).** Thymidylate kinase: an old topic brings new perspectives. *Current medicinal chemistry* **20**, 1286-1305.
- Cyrklaff, M., Risco, C., Fernandez, J. J., Jimenez, M. V., Esteban, M., Baumeister, W. & Carrascosa, J. L. (2005).** Cryo-electron tomography of vaccinia virus. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **102**, 2772-2777.
- Chakrabarti, S., Brechling, K. & Moss, B. (1985).** Vaccinia virus expression vector: coexpression of beta-galactosidase provides visual screening of recombinant virus plaques. *Molecular and cellular biology* **5**, 3403-3409.
- Chalikonda, S., Kivlen, M. H., O'Malley, M. E., Eric Dong, X. D., McCart, J. A., Gorry, M. C., Yin, X. Y., Brown, C. K., Zeh, H. J., 3rd, Guo, Z. S. & Bartlett, D. L. (2008).** Oncolytic virotherapy for ovarian carcinomatosis using a replication-selective vaccinia virus armed with a yeast cytosine deaminase gene. *Cancer gene therapy* **15**, 115-125.

- Chang, C. Y., Tai, J. A., Li, S., Nishikawa, T. & Kaneda, Y. (2016).** Virus-stimulated neutrophils in the tumor microenvironment enhance T cell-mediated anti-tumor immunity. *Oncotarget*.
- Chen, L. (2004).** Co-inhibitory molecules of the B7-CD28 family in the control of T-cell immunity. *Nature reviews Immunology* **4**, 336-347.
- Chiang, C. L., Kandalaf, L. E. & Coukos, G. (2011).** Adjuvants for enhancing the immunogenicity of whole tumor cell vaccines. *International reviews of immunology* **30**, 150-182.
- Choi, Y. & Chang, J. (2013).** Viral vectors for vaccine applications. *Clinical and experimental vaccine research* **2**, 97-105.
- Dales, S. (1965).** Replication of Animal Viruses as Studied by Electron Microscopy. *The American journal of medicine* **38**, 699-715.
- Day, C. L., Kaufmann, D. E., Kiepiela, P., Brown, J. A., Moodley, E. S., Reddy, S., Mackey, E. W., Miller, J. D., Leslie, A. J., DePierres, C., Mncube, Z., Duraiswamy, J., Zhu, B., Eichbaum, Q., Altfeld, M., Wherry, E. J., Coovadia, H. M., Goulder, P. J., Klenerman, P., Ahmed, R., Freeman, G. J. & Walker, B. D. (2006).** PD-1 expression on HIV-specific T cells is associated with T-cell exhaustion and disease progression. *Nature* **443**, 350-354.
- de Magalhaes, J. C., Andrade, A. A., Silva, P. N., Sousa, L. P., Ropert, C., Ferreira, P. C., Kroon, E. G., Gazzinelli, R. T. & Bonjardim, C. A. (2001).** A mitogenic signal triggered at an early stage of vaccinia virus infection: implication of MEK/ERK and protein kinase A in virus multiplication. *The Journal of biological chemistry* **276**, 38353-38360.
- de Vries, C. R., Monken, C. E. & Lattime, E. C. (2015).** The addition of recombinant vaccinia HER2/neu to oncolytic vaccinia-GMCSF given into the tumor microenvironment overcomes MDSC-mediated immune escape and systemic energy. *Cancer gene therapy* **22**, 154-162.
- DeNardo, D. G., Andreu, P. & Coussens, L. M. (2010).** Interactions between lymphocytes and myeloid cells regulate pro- versus anti-tumor immunity. *Cancer metastasis reviews* **29**, 309-316.
- Di Pilato, M., Mejias-Perez, E., Zonca, M., Perdiguero, B., Gomez, C. E., Trakala, M., Nieto, J., Najera, J. L., Sorzano, C. O., Combadiere, C., Pantaleo, G., Planelles, L. & Esteban, M. (2015a).** NFkappaB activation by modified vaccinia virus as a novel strategy to enhance neutrophil migration and HIV-specific T-cell

responses. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **112**, E1333-1342.

- Di Pilato, M., Sanchez-Sampedro, L., Mejias-Perez, E., Sorzano, C. O. & Esteban, M. (2015b).** Modification of promoter spacer length in vaccinia virus as a strategy to control the antigen expression. *The Journal of general virology* **96**, 2360-2371.
- Dimitrov, D. S. (2004).** Virus entry: molecular mechanisms and biomedical applications. *Nature reviews Microbiology* **2**, 109-122.
- Dock, G. (1904).** The Influence of Complicating Diseases Upon Leukaemia. *The American Journal of the Medical Sciences* **127(4)**, 563-592.
- Duffy, D., Perrin, H., Abadie, V., Benhabiles, N., Boissonnas, A., Liard, C., Descours, B., Reboulleau, D., Bonduelle, O., Verrier, B., Van Rooijen, N., Combadiere, C. & Combadiere, B. (2012).** Neutrophils transport antigen from the dermis to the bone marrow, initiating a source of memory CD8+ T cells. *Immunity* **37**, 917-929.
- Egeblad, M., Nakasone, E. S. & Werb, Z. (2010).** Tumors as organs: complex tissues that interface with the entire organism. *Developmental cell* **18**, 884-901.
- Esplugues, E., Sancho, D., Vega-Ramos, J., Martinez, C., Syrbe, U., Hamann, A., Engel, P., Sanchez-Madrid, F. & Lauzurica, P. (2003).** Enhanced antitumor immunity in mice deficient in CD69. *The Journal of experimental medicine* **197**, 1093-1106.
- Esposito, J. J., Obijeski, J. F. & Nakano, J. H. (1977a).** Serological relatedness of monkeypox, variola, and vaccinia viruses. *Journal of medical virology* **1**, 35-47.
- Esposito, J. J., Obijeski, J. F. & Nakano, J. H. (1977b).** The virion and soluble antigen proteins of variola, monkeypox, and vaccinia viruses. *Journal of medical virology* **1**, 95-110.
- Esteban, M. (1984).** Defective vaccinia virus particles in interferon-treated infected cells. *Virology* **133**, 220-227.
- Esteban, M., Flores, L. & Holowczak, J. A. (1977).** Model for vaccinia virus DNA replication. *Virology* **83**, 467-473.
- Fahy, A. S., Clark, R. H., Glyde, E. F. & Smith, G. L. (2008).** Vaccinia virus protein C16 acts intracellularly to modulate the host response and promote virulence. *The Journal of general virology* **89**, 2377-2387.

- Feron, O. (2009).** Pyruvate into lactate and back: from the Warburg effect to symbiotic energy fuel exchange in cancer cells. *Radiotherapy and oncology : journal of the European Society for Therapeutic Radiology and Oncology* **92**, 329-333.
- Foloppe, J., Kintz, J., Futin, N., Findeli, A., Cordier, P., Schlesinger, Y., Hoffmann, C., Tosch, C., Balloul, J. M. & Erbs, P. (2008).** Targeted delivery of a suicide gene to human colorectal tumors by a conditionally replicating vaccinia virus. *Gene therapy* **15**, 1361-1371.
- Fridlender, Z. G. & Albelda, S. M. (2012).** Tumor-associated neutrophils: friend or foe? *Carcinogenesis* **33**, 949-955.
- Fridlender, Z. G., Sun, J., Kim, S., Kapoor, V., Cheng, G., Ling, L., Worthen, G. S. & Albelda, S. M. (2009).** Polarization of tumor-associated neutrophil phenotype by TGF-beta: "N1" versus "N2" TAN. *Cancer cell* **16**, 183-194.
- Friedrich, J., Seidel, C., Ebner, R. & Kunz-Schughart, L. A. (2009).** Spheroid-based drug screen: considerations and practical approach. *Nature protocols* **4**, 309-324.
- Funt, S. A., Page, D. B., Wolchok, J. D. & Postow, M. A. (2014).** CTLA-4 antibodies: new directions, new combinations. *Oncology* **28 Suppl 3**, 6-14.
- Gajewski, T. F., Schreiber, H. & Fu, Y. X. (2013).** Innate and adaptive immune cells in the tumor microenvironment. *Nature immunology* **14**, 1014-1022.
- Galluzzi, L., Vacchelli, E., Fridman, W. H., Galon, J., Sautes-Fridman, C., Tartour, E., Zucman-Rossi, J., Zitvogel, L. & Kroemer, G. (2012).** Trial Watch: Monoclonal antibodies in cancer therapy. *Oncoimmunology* **1**, 28-37.
- Gentschev, I., Adelfinger, M., Josupeit, R., Rudolph, S., Ehrig, K., Donat, U., Weibel, S., Chen, N. G., Yu, Y. A., Zhang, Q., Heisig, M., Thamm, D., Stritzker, J., Macneill, A. & Szalay, A. A. (2012).** Preclinical evaluation of oncolytic vaccinia virus for therapy of canine soft tissue sarcoma. *PloS one* **7**, e37239.
- Georgiades, J., Zielinski, T., Cicholska, A. & Jordan, E. (1959).** Research on the oncolytic effect of APC viruses in cancer of the cervix uteri; preliminary report. *Biuletyn Instytutu Medycyny Morskiej w Gdansk* **10**, 49-57.
- Gerlic, M., Faustin, B., Postigo, A., Yu, E. C., Proell, M., Gombosuren, N., Krajewska, M., Flynn, R., Croft, M., Way, M., Satterthwait, A., Liddington, R. C., Salek-Ardakani, S., Matsuzawa, S. & Reed, J. C. (2013).** Vaccinia virus F1L protein promotes virulence by inhibiting inflammasome activation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **110**, 7808-7813.

- Goebel, S. J., Johnson, G. P., Perkus, M. E., Davis, S. W., Winslow, J. P. & Paoletti, E. (1990).** The complete DNA sequence of vaccinia virus. *Virology* **179**, 247-266, 517-263.
- Gorelik, L. & Flavell, R. A. (2000).** Abrogation of TGFbeta signaling in T cells leads to spontaneous T cell differentiation and autoimmune disease. *Immunity* **12**, 171-181.
- Green, M. R. & Sambrook, J. (2012).** *Molecular Cloning: a laboratory manual*.
- Greseth, M. D. & Traktman, P. (2014).** De novo fatty acid biosynthesis contributes significantly to establishment of a bioenergetically favorable environment for vaccinia virus infection. *PLoS pathogens* **10**, e1004021.
- Grivennikov, S. I., Greten, F. R. & Karin, M. (2010).** Immunity, inflammation, and cancer. *Cell* **140**, 883-899.
- Gubser, C., Hue, S., Kellam, P. & Smith, G. L. (2004).** Poxvirus genomes: a phylogenetic analysis. *The Journal of general virology* **85**, 105-117.
- Gulley, J. L., Mulders, P., Albers, P., Banchereau, J., Bolla, M., Pantel, K. & Powles, T. (2016).** Perspectives on sipuleucel-T: Its role in the prostate cancer treatment paradigm. *Oncoimmunology* **5**, e1107698.
- Hanahan, D. & Weinberg, R. A. (2011).** Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell* **144**, 646-674.
- Harrop, R., Chu, F., Gabrail, N., Srinivas, S., Blount, D. & Ferrari, A. (2013).** Vaccination of castration-resistant prostate cancer patients with TroVax (MVA-5T4) in combination with docetaxel: a randomized phase II trial. *Cancer immunology, immunotherapy : CII* **62**, 1511-1520.
- Hattar, K., Franz, K., Ludwig, M., Sibelius, U., Wilhelm, J., Lohmeyer, J., Savai, R., Subtil, F. S., Dahlem, G., Eul, B., Seeger, W., Grimminger, F. & Grandel, U. (2014).** Interactions between neutrophils and non-small cell lung cancer cells: enhancement of tumor proliferation and inflammatory mediator synthesis. *Cancer immunology, immunotherapy : CII* **63**, 1297-1306.
- Hirschhaeuser, F., Menne, H., Dittfeld, C., West, J., Mueller-Klieser, W. & Kunz-Schughart, L. A. (2010).** Multicellular tumor spheroids: an underestimated tool is catching up again. *Journal of biotechnology* **148**, 3-15.
- Hodi, F. S., O'Day, S. J., McDermott, D. F., Weber, R. W., Sosman, J. A., Haanen, J. B., Gonzalez, R., Robert, C., Schadendorf, D., Hassel, J. C., Akerley, W., van den Eertwegh, A. J., Lutzky, J., Lorigan, P., Vaubel, J. M., Linette, G. P.,**

- Hogg, D., Ottensmeier, C. H., Lebbe, C., Peschel, C., Quirt, I., Clark, J. I., Wolchok, J. D., Weber, J. S., Tian, J., Yellin, M. J., Nichol, G. M., Hoos, A. & Urba, W. J. (2010).** Improved survival with ipilimumab in patients with metastatic melanoma. *The New England journal of medicine* **363**, 711-723.
- Hollinshead, M., Vanderplasschen, A., Smith, G. L. & Vaux, D. J. (1999).** Vaccinia virus intracellular mature virions contain only one lipid membrane. *Journal of virology* **73**, 1503-1517.
- Hoster, H. A., Zanes, R. P., Jr. & Von Haam, E. (1949).** Studies in Hodgkin's syndrome; the association of viral hepatitis and Hodgkin's disease; a preliminary report. *Cancer research* **9**, 473-480.
- Hughes, A. L., Irausquin, S. & Friedman, R. (2010).** The evolutionary biology of poxviruses. *Infection, genetics and evolution : journal of molecular epidemiology and evolutionary genetics in infectious diseases* **10**, 50-59.
- Hughes, S. J., Johnston, L. H., de Carlos, A. & Smith, G. L. (1991).** Vaccinia virus encodes an active thymidylate kinase that complements a cdc8 mutant of *Saccharomyces cerevisiae*. *The Journal of biological chemistry* **266**, 20103-20109.
- Husseini, F., Delord, J. P., Fournel-Federico, C., Guitton, J., Erbs, P., Homerin, M., Halluard, C., Jemming, C., Orange, C., Limacher, J. M. & Kurtz, J. E. (2016).** Vectorized Gene Therapy of Liver Tumors: Proof of Concept of TG4023 (MVA-FCU1) in Combination with Flucytosine. *Annals of oncology : official journal of the European Society for Medical Oncology*.
- Jablonska, J., Leschner, S., Westphal, K., Lienenklaus, S. & Weiss, S. (2010).** Neutrophils responsive to endogenous IFN-beta regulate tumor angiogenesis and growth in a mouse tumor model. *The Journal of clinical investigation* **120**, 1151-1164.
- Jin, H. T., Anderson, A. C., Tan, W. G., West, E. E., Ha, S. J., Araki, K., Freeman, G. J., Kuchroo, V. K. & Ahmed, R. (2010).** Cooperation of Tim-3 and PD-1 in CD8 T-cell exhaustion during chronic viral infection. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **107**, 14733-14738.
- Johnston, J. B. & McFadden, G. (2003).** Poxvirus immunomodulatory strategies: current perspectives. *Journal of virology* **77**, 6093-6100.
- Joklik, W. K. (1962).** The purification of four strains of poxvirus. *Virology* **18**, 9-18.
- Joklik, W. K. & Becker, Y. (1964).** The Replication and Coating of Vaccinia DNA. *Journal of molecular biology* **10**, 452-474.

- Jun, K. H., Gholami, S., Song, T. J., Au, J., Haddad, D., Carson, J., Chen, C. H., Mojica, K., Zanzonico, P., Chen, N. G., Zhang, Q., Szalay, A. & Fong, Y. (2014).** A novel oncolytic viral therapy and imaging technique for gastric cancer using a genetically engineered vaccinia virus carrying the human sodium iodide symporter. *Journal of experimental & clinical cancer research : CR* **33**, 2.
- Keck, J. G., Baldick, C. J., Jr. & Moss, B. (1990).** Role of DNA replication in vaccinia virus gene expression: a naked template is required for transcription of three late trans-activator genes. *Cell* **61**, 801-809.
- Kehrl, J. H., Wakefield, L. M., Roberts, A. B., Jakowlew, S., Alvarez-Mon, M., Derynck, R., Sporn, M. B. & Fauci, A. S. (1986).** Production of transforming growth factor beta by human T lymphocytes and its potential role in the regulation of T cell growth. *The Journal of experimental medicine* **163**, 1037-1050.
- Keller, B. A. & Bell, J. C. (2016).** Oncolytic viruses-immunotherapeutics on the rise. *Journal of molecular medicine* **94**, 979-991.
- Kelly, E. & Russell, S. J. (2007).** History of oncolytic viruses: genesis to genetic engineering. *Molecular therapy : the journal of the American Society of Gene Therapy* **15**, 651-659.
- Kennedy, R. B., Ovsyannikova, I. G., Jacobson, R. M. & Poland, G. A. (2009).** The immunology of smallpox vaccines. *Current opinion in immunology* **21**, 314-320.
- Kim, J. H., Oh, J. Y., Park, B. H., Lee, D. E., Kim, J. S., Park, H. E., Roh, M. S., Je, J. E., Yoon, J. H., Thorne, S. H., Kirn, D. & Hwang, T. H. (2006).** Systemic armed oncolytic and immunologic therapy for cancer with JX-594, a targeted poxvirus expressing GM-CSF. *Molecular therapy : the journal of the American Society of Gene Therapy* **14**, 361-370.
- Kirn, D. H. & Thorne, S. H. (2009).** Targeted and armed oncolytic poxviruses: a novel multi-mechanistic therapeutic class for cancer. *Nature reviews Cancer* **9**, 64-71.
- Kirn, D. H., Wang, Y., Le Boeuf, F., Bell, J. & Thorne, S. H. (2007).** Targeting of interferon-beta to produce a specific, multi-mechanistic oncolytic vaccinia virus. *PLoS medicine* **4**, e353.
- Kirn, D. H., Wang, Y., Liang, W., Contag, C. H. & Thorne, S. H. (2008).** Enhancing poxvirus oncolytic effects through increased spread and immune evasion. *Cancer research* **68**, 2071-2075.

- Kobayashi, T., Hamaguchi, Y., Hasegawa, M., Fujimoto, M., Takehara, K. & Matsushita, T. (2014).** B cells promote tumor immunity against B16F10 melanoma. *The American journal of pathology* **184**, 3120-3129.
- L., E. P. & Moss, B. (1991).** Preparations of cell cultures and vaccinia virus stocks. In *Current Protocols in Molecular Biology*. Edited by F. M. Ausubel, et al., eds. : Wiley Interscience, NY.
- Law, M., Carter, G. C., Roberts, K. L., Hollinshead, M. & Smith, G. L. (2006).** Ligand-induced and nonfusogenic dissolution of a viral membrane. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **103**, 5989-5994.
- Law, M., Putz, M. M. & Smith, G. L. (2005).** An investigation of the therapeutic value of vaccinia-immune IgG in a mouse pneumonia model. *The Journal of general virology* **86**, 991-1000.
- Lee, S. J., Yang, A., Wu, T. C. & Hung, C. F. (2016).** Immunotherapy for human papillomavirus-associated disease and cervical cancer: review of clinical and translational research. *Journal of gynecologic oncology* **27**, e51.
- Lemmon, M. A. & Schlessinger, J. (2010).** Cell signaling by receptor tyrosine kinases. *Cell* **141**, 1117-1134.
- Lichty, B. D., Breitbach, C. J., Stojdl, D. F. & Bell, J. C. (2014).** Going viral with cancer immunotherapy. *Nature reviews Cancer* **14**, 559-567.
- Lipson, E. J., Sharfman, W. H., Chen, S., McMiller, T. L., Pritchard, T. S., Salas, J. T., Sartorius-Mergenthaler, S., Freed, I., Ravi, S., Wang, H., Lubner, B., Sproul, J. D., Taube, J. M., Pardoll, D. M. & Topalian, S. L. (2015).** Safety and immunologic correlates of Melanoma GVAX, a GM-CSF secreting allogeneic melanoma cell vaccine administered in the adjuvant setting. *Journal of translational medicine* **13**, 214.
- Liu, L., Cooper, T., Howley, P. M. & Hayball, J. D. (2014).** From crescent to mature virion: vaccinia virus assembly and maturation. *Viruses* **6**, 3787-3808.
- Liu, Y. & Zeng, G. (2012).** Cancer and innate immune system interactions: translational potentials for cancer immunotherapy. *Journal of immunotherapy* **35**, 299-308.
- Ludwig, J. A. & Weinstein, J. N. (2005).** Biomarkers in cancer staging, prognosis and treatment selection. *Nature reviews Cancer* **5**, 845-856.
- Makkouk, A. & Weiner, G. J. (2015).** Cancer immunotherapy and breaking immune tolerance: new approaches to an old challenge. *Cancer research* **75**, 5-10.

- May, C., Sapra, P. & Gerber, H. P. (2012).** Advances in bispecific biotherapeutics for the treatment of cancer. *Biochemical pharmacology* **84**, 1105-1112.
- Mazzon, M., Castro, C., Roberts, L. D., Griffin, J. L. & Smith, G. L. (2015).** A role for vaccinia virus protein C16 in reprogramming cellular energy metabolism. *The Journal of general virology* **96**, 395-407.
- Mazzon, M., Peters, N. E., Loenarz, C., Kryzstofinska, E. M., Ember, S. W., Ferguson, B. J. & Smith, G. L. (2013).** A mechanism for induction of a hypoxic response by vaccinia virus. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **110**, 12444-12449.
- McCart, J. A., Ward, J. M., Lee, J., Hu, Y., Alexander, H. R., Libutti, S. K., Moss, B. & Bartlett, D. L. (2001).** Systemic cancer therapy with a tumor-selective vaccinia virus mutant lacking thymidine kinase and vaccinia growth factor genes. *Cancer research* **61**, 8751-8757.
- McFadden, G. (2005a).** Poxvirus tropism. *Nature reviews Microbiology* **3**, 201-213.
- McFADDEN, J. B. J. a. G. (2005b).** IMMUNOMODULATION BY POXVIRUSES. In *Modulation of Host Gene Expression and Innate Immunity by Viruses*, pp. 163-195. Edited by P. Palese. Netherlands.: Springer.
- Merchlinsky, M. (1990).** Mutational analysis of the resolution sequence of vaccinia virus DNA: essential sequence consists of two separate AT-rich regions highly conserved among poxviruses. *Journal of virology* **64**, 5029-5035.
- Merchlinsky, M. & Moss, B. (1989).** Nucleotide sequence required for resolution of the concatemer junction of vaccinia virus DNA. *Journal of virology* **63**, 4354-4361.
- Miller, J. D., van der Most, R. G., Akondy, R. S., Glidewell, J. T., Albott, S., Masopust, D., Murali-Krishna, K., Mahar, P. L., Edupuganti, S., Lalor, S., Germon, S., Del Rio, C., Mulligan, M. J., Staprans, S. I., Altman, J. D., Feinberg, M. B. & Ahmed, R. (2008).** Human effector and memory CD8+ T cell responses to smallpox and yellow fever vaccines. *Immunity* **28**, 710-722.
- Mishalian, I., Bayuh, R., Levy, L., Zolotarov, L., Michaeli, J. & Fridlender, Z. G. (2013).** Tumor-associated neutrophils (TAN) develop pro-tumorigenic properties during tumor progression. *Cancer immunology, immunotherapy : CII* **62**, 1745-1756.
- Miyahira, Y., Murata, K., Rodriguez, D., Rodriguez, J. R., Esteban, M., Rodrigues, M. M. & Zavala, F. (1995).** Quantification of antigen specific CD8+ T cells using an ELISPOT assay. *Journal of immunological methods* **181**, 45-54.

- Modjtahedi, H., Cho, B. C., Michel, M. C. & Solca, F. (2014).** A comprehensive review of the preclinical efficacy profile of the ErbB family blocker afatinib in cancer. *Naunyn-Schmiedeberg's archives of pharmacology* **387**, 505-521.
- Moss, B. (1991).** Vaccinia virus: a tool for research and vaccine development. *Science* **252**, 1662-1667.
- Moss, B. (1996).** Genetically engineered poxviruses for recombinant gene expression, vaccination, and safety. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **93**, 11341-11348.
- Moss, B. (2007).** *Poxviridae: The Viruses and Their Replication*: Lippincott-Raven.
- Moss, B. (2012).** Poxvirus cell entry: how many proteins does it take? *Viruses* **4**, 688-707.
- Motzer, R. J., Escudier, B., Tomczak, P., Hutson, T. E., Michaelson, M. D., Negrier, S., Oudard, S., Gore, M. E., Tarazi, J., Hariharan, S., Chen, C., Rosbrook, B., Kim, S. & Rini, B. I. (2013).** Axitinib versus sorafenib as second-line treatment for advanced renal cell carcinoma: overall survival analysis and updated results from a randomised phase 3 trial. *The Lancet Oncology* **14**, 552-562.
- Munyon, W., Paoletti, E. & Grace, J. T., Jr. (1967).** RNA polymerase activity in purified infectious vaccinia virus. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **58**, 2280-2287.
- Neal, R. D., Tharmanathan, P., France, B., Din, N. U., Cotton, S., Fallon-Ferguson, J., Hamilton, W., Hendry, A., Hendry, M., Lewis, R., Macleod, U., Mitchell, E. D., Pickett, M., Rai, T., Shaw, K., Stuart, N., Topping, M. L., Wilkinson, C., Williams, B., Williams, N. & Emery, J. (2015).** Is increased time to diagnosis and treatment in symptomatic cancer associated with poorer outcomes? Systematic review. *British journal of cancer* **112 Suppl 1**, S92-107.
- Paoletti, E. (1996).** Applications of pox virus vectors to vaccination: an update. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **93**, 11349-11353.
- Parker RF, B. L., Green RH (1941).** Further studies on the infectious unit of vaccinia. *The Journal of experimental medicine* **74**, 268-281.
- Parviainen, S., Ahonen, M., Diaconu, I., Kipar, A., Siurala, M., Vaha-Koskela, M., Kanerva, A., Cerullo, V. & Hemminki, A. (2015).** GMCSF-armed vaccinia virus induces an antitumor immune response. *International journal of cancer* **136**, 1065-1072.

- Peters, N. E., Ferguson, B. J., Mazzon, M., Fahy, A. S., Kryzstofinska, E., Arribas-Bosacoma, R., Pearl, L. H., Ren, H. & Smith, G. L. (2013).** A mechanism for the inhibition of DNA-PK-mediated DNA sensing by a virus. *PLoS pathogens* **9**, e1003649.
- Polyak, K. & Weinberg, R. A. (2009).** Transitions between epithelial and mesenchymal states: acquisition of malignant and stem cell traits. *Nature reviews Cancer* **9**, 265-273.
- Putz, M. M., Midgley, C. M., Law, M. & Smith, G. L. (2006).** Quantification of antibody responses against multiple antigens of the two infectious forms of Vaccinia virus provides a benchmark for smallpox vaccination. *Nature medicine* **12**, 1310-1315.
- Qian, B. Z. & Pollard, J. W. (2010).** Macrophage diversity enhances tumor progression and metastasis. *Cell* **141**, 39-51.
- Rabin, B. A., Gaglio, B., Sanders, T., Nekhlyudov, L., Dearing, J. W., Bull, S., Glasgow, R. E. & Marcus, A. (2013).** Predicting cancer prognosis using interactive online tools: a systematic review and implications for cancer care providers. *Cancer epidemiology, biomarkers & prevention : a publication of the American Association for Cancer Research, cosponsored by the American Society of Preventive Oncology* **22**, 1645-1656.
- Rodriguez-Enriquez, S., Gallardo-Perez, J. C., Aviles-Salas, A., Marin-Hernandez, A., Carreno-Fuentes, L., Maldonado-Lagunas, V. & Moreno-Sanchez, R. (2008).** Energy metabolism transition in multi-cellular human tumor spheroids. *Journal of cellular physiology* **216**, 189-197.
- Rodriguez, D., Rodriguez, J. R., Rodriguez, J. F., Trauber, D. & Esteban, M. (1989).** Highly attenuated vaccinia virus mutants for the generation of safe recombinant viruses. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **86**, 1287-1291.
- Rosenberg, S. A., Yannelli, J. R., Yang, J. C., Topalian, S. L., Schwartzentruber, D. J., Weber, J. S., Parkinson, D. R., Seipp, C. A., Einhorn, J. H. & White, D. E. (1994).** Treatment of patients with metastatic melanoma with autologous tumor-infiltrating lymphocytes and interleukin 2. *Journal of the National Cancer Institute* **86**, 1159-1166.
- Rowe, J. & Cen, P. (2014).** TroVax in colorectal cancer. *Human vaccines & immunotherapeutics* **10**, 3196-3200.

- Rubartelli, A. & Lotze, M. T. (2007).** Inside, outside, upside down: damage-associated molecular-pattern molecules (DAMPs) and redox. *Trends in immunology* **28**, 429-436.
- Sakuishi, K., Apetoh, L., Sullivan, J. M., Blazar, B. R., Kuchroo, V. K. & Anderson, A. C. (2010).** Targeting Tim-3 and PD-1 pathways to reverse T cell exhaustion and restore anti-tumor immunity. *The Journal of experimental medicine* **207**, 2187-2194.
- Salzman, N. P. (1960).** The rate of formation of vaccinia deoxyribonucleic acid and vaccinia virus. *Virology* **10**, 150-152.
- Sanchez-Sampedro, L., Perdiguero, B., Mejias-Perez, E., Garcia-Arriaza, J., Di Pilato, M. & Esteban, M. (2015).** The evolution of poxvirus vaccines. *Viruses* **7**, 1726-1803.
- Sarov, I. & Joklik, W. K. (1972).** Characterization of intermediates in the uncoating of vaccinia virus DNA. *Virology* **50**, 593-602.
- Schuster, S. J., Neelapu, S. S., Gause, B. L., Janik, J. E., Muggia, F. M., Gockerman, J. P., Winter, J. N., Flowers, C. R., Nikcevich, D. A., Sotomayor, E. M., McGaughey, D. S., Jaffe, E. S., Chong, E. A., Reynolds, C. W., Berry, D. A., Santos, C. F., Popa, M. A., McCord, A. M. & Kwak, L. W. (2011).** Vaccination with patient-specific tumor-derived antigen in first remission improves disease-free survival in follicular lymphoma. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology* **29**, 2787-2794.
- Schwartzentruber, D. J., Lawson, D. H., Richards, J. M., Conry, R. M., Miller, D. M., Treisman, J., Gailani, F., Riley, L., Conlon, K., Pockaj, B., Kendra, K. L., White, R. L., Gonzalez, R., Kuzel, T. M., Curti, B., Leming, P. D., Whitman, E. D., Balkissoon, J., Reintgen, D. S., Kaufman, H., Marincola, F. M., Merino, M. J., Rosenberg, S. A., Choyke, P., Vena, D. & Hwu, P. (2011).** gp100 peptide vaccine and interleukin-2 in patients with advanced melanoma. *The New England journal of medicine* **364**, 2119-2127.
- Smith, G. L. (1990).** *Vaccinia: virus, vector and vaccine.*: Cambridge University Press.
- Smith, G. L. & Moss, B. (1983).** Infectious poxvirus vectors have capacity for at least 25 000 base pairs of foreign DNA. *Gene* **25**, 21-28.

- Smith, G. L., Vanderplasschen, A. & Law, M. (2002).** The formation and function of extracellular enveloped vaccinia virus. *The Journal of general virology* **83**, 2915-2931.
- Soloski, M. J. & Holowczak, J. A. (1981).** Characterization of supercoiled nucleoprotein complexes released from detergent-treated vaccinia virions. *Journal of virology* **37**, 770-783.
- Southam, C. M. & Moore, A. E. (1952).** Clinical studies of viruses as antineoplastic agents with particular reference to Egypt 101 virus. *Cancer* **5**, 1025-1034.
- Stickl, H. & Hochstein-Mintzel, V. (1971).** [Intracutaneous smallpox vaccination with a weak pathogenic vaccinia virus ("MVA virus")]. *Munchener medizinische Wochenschrift* **113**, 1149-1153.
- Suzuki, S., Ishida, T., Yoshikawa, K. & Ueda, R. (2016).** Current status of immunotherapy. *Japanese journal of clinical oncology* **46**, 191-203.
- Swaika, A., Hammond, W. A. & Joseph, R. W. (2015).** Current state of anti-PD-L1 and anti-PD-1 agents in cancer therapy. *Molecular immunology* **67**, 4-17.
- Symons, J. A., Alcami, A. & Smith, G. L. (1995).** Vaccinia virus encodes a soluble type I interferon receptor of novel structure and broad species specificity. *Cell* **81**, 551-560.
- Tartaglia, J., Perkus, M. E., Taylor, J., Norton, E. K., Audonnet, J. C., Cox, W. I., Davis, S. W., van der Hoeven, J., Meignier, B., Riviere, M. & et al. (1992).** NYVAC: a highly attenuated strain of vaccinia virus. *Virology* **188**, 217-232.
- Tiffen, J. C., Bailey, C. G., Ng, C., Rasko, J. E. & Holst, J. (2010).** Luciferase expression and bioluminescence does not affect tumor cell growth in vitro or in vivo. *Molecular cancer* **9**, 299.
- Tough, D. F., Sun, S. & Sprent, J. (1997).** T cell stimulation in vivo by lipopolysaccharide (LPS). *The Journal of experimental medicine* **185**, 2089-2094.
- Traktman, P. (1991).** *Molecular genetic and biochemical analysis of poxvirus DNA replication*: Semin Virol.
- Tschannen, R. & Schafer, R. (1980).** Strain and host-cell dependence of vaccinia virus proteins. *European journal of biochemistry / FEBS* **111**, 145-150.
- Tschannen, R., Steck, A. J. & Schafer, R. (1979).** Mechanisms in the pathogenesis of post-infectious vaccinia virus encephalomyelitis in the mouse. *Neuroscience letters* **15**, 295-300.

- Tscharke, D. C., Karupiah, G., Zhou, J., Palmore, T., Irvine, K. R., Haeryfar, S. M., Williams, S., Sidney, J., Sette, A., Bennink, J. R. & Yewdell, J. W. (2005).** Identification of poxvirus CD8+ T cell determinants to enable rational design and characterization of smallpox vaccines. *The Journal of experimental medicine* **201**, 95-104.
- Upton, C., Slack, S., Hunter, A. L., Ehlers, A. & Roper, R. L. (2003).** Poxvirus orthologous clusters: toward defining the minimum essential poxvirus genome. *Journal of virology* **77**, 7590-7600.
- Vacchelli, E., Galluzzi, L., Eggermont, A., Galon, J., Tartour, E., Zitvogel, L. & Kroemer, G. (2012).** Trial Watch: Immunostimulatory cytokines. *Oncoimmunology* **1**, 493-506.
- Vander Heiden, M. G., Cantley, L. C. & Thompson, C. B. (2009).** Understanding the Warburg effect: the metabolic requirements of cell proliferation. *Science* **324**, 1029-1033.
- Vos, J. C. & Stunnenberg, H. G. (1988).** Derepression of a novel class of vaccinia virus genes upon DNA replication. *The EMBO journal* **7**, 3487-3492.
- Wang, L. C., Lynn, R. C., Cheng, G., Alexander, E., Kapoor, V., Moon, E. K., Sun, J., Fridlender, Z. G., Isaacs, S. N., Thorne, S. H. & Albelda, S. M. (2012).** Treating tumors with a vaccinia virus expressing IFNbeta illustrates the complex relationships between oncolytic ability and immunogenicity. *Molecular therapy : the journal of the American Society of Gene Therapy* **20**, 736-748.
- Wasilenko, S. T., Stewart, T. L., Meyers, A. F. & Barry, M. (2003).** Vaccinia virus encodes a previously uncharacterized mitochondrial-associated inhibitor of apoptosis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **100**, 14345-14350.
- Watkins, S. K., Zhu, Z., Watkins, K. E. & Hurwitz, A. A. (2012).** Isolation of immune cells from primary tumors. *Journal of visualized experiments : JoVE*, e3952.
- Wein, L. M., Wu, J. T. & Kirn, D. H. (2003).** Validation and analysis of a mathematical model of a replication-competent oncolytic virus for cancer treatment: implications for virus design and delivery. *Cancer research* **63**, 1317-1324.
- WILD, B. W. S. a. C. P. (2014).** *World Cancer Report 2014*: International Agency for Research on Cancer, World Health Organization.

- Witsch, E., Sela, M. & Yarden, Y. (2010).** Roles for growth factors in cancer progression. *Physiology* **25**, 85-101.
- Wolchok, J. D., Yang, A. S. & Weber, J. S. (2010).** Immune regulatory antibodies: are they the next advance? *Cancer journal* **16**, 311-317.
- Woo, S. R., Corrales, L. & Gajewski, T. F. (2015).** Innate immune recognition of cancer. *Annual review of immunology* **33**, 445-474.
- Xue, D., Liang, Y., Duan, S., He, J., Su, J., Zhu, J., Hu, N., Liu, J., Zhao, Y. & Lu, X. (2016).** Enhanced anti-tumor immunity against breast cancer induced by whole tumor cell vaccines genetically modified expressing alpha-Gal epitopes. *Oncology reports*.
- Yang, Z. Z., Grote, D. M., Ziesmer, S. C., Xiu, B., Novak, A. J. & Ansell, S. M. (2015).** PD-1 expression defines two distinct T-cell sub-populations in follicular lymphoma that differentially impact patient survival. *Blood cancer journal* **5**, e281.
- Zajac, P., Schutz, A., Oertli, D., Noppen, C., Schaefer, C., Heberer, M., Spagnoli, G. C. & Marti, W. R. (1998).** Enhanced generation of cytotoxic T lymphocytes using recombinant vaccinia virus expressing human tumor-associated antigens and B7 costimulatory molecules. *Cancer research* **58**, 4567-4571.
- Zhu, J., Martinez, J., Huang, X. & Yang, Y. (2007).** Innate immunity against vaccinia virus is mediated by TLR2 and requires TLR-independent production of IFN-beta. *Blood* **109**, 619-625.

Anexo