

**FACULTAD DE CIENCIAS
DEPARTAMENTO DE BIOLOGÍA MOLECULAR
PROGRAMA DE DOCTORADO EN BIOCENCIAS MOLECULARES**

**Ingeniería de dominios funcionales de la cápsida del Parvovirus MVM
con péptidos que bloquean VEGF:
efectos en ensamblaje, inmunogenicidad y tropismo**

TESIS DOCTORAL

**Tania Calvo López
Madrid, 2021**

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE MADRID
FACULTAD DE CIENCIAS
DEPARTAMENTO DE BIOLOGÍA MOLECULAR

Ingeniería de dominios funcionales de la cápsida del Parvovirus MVM
con péptidos que bloquean VEGF:
efectos en ensamblaje, inmunogenicidad y tropismo

MEMORIA PRESENTADA POR LA GRADUADA EN BIOLOGÍA
TANIA CALVO LÓPEZ
PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR EN CIENCIAS
POR LA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE MADRID

Este trabajo se ha realizado en el Centro de Biología Molecular “Severo Ochoa”
(CSIC-UAM) Madrid (España) bajo la dirección del Dr. José María Almendral del Río

Madrid, 2021

Este trabajo ha sido realizado en el Centro de Biología Molecular “Severo Ochoa” (CSIC-UAM) bajo la dirección del Dr. José M. Almendral del Río, financiado por los proyectos SAF2015-68522-P-MINECO/FEDER, UE (Ministerio de Ciencia, Investigación y Universidades), PID2019-111146RB-I00 (Ministerio de Ciencia e Innovación), y S2013/ABI-2906-FEDER (Comunidad de Madrid). Tania Calvo López recibió un contrato de la Comunidad de Madrid (PEJ16/MED/AI-0818).

Cantoblanco, 20 de septiembre de 2021

Estimados/as Sres./Sras.:

En el presente documento certifico que esta memoria ha sido presentada al Departamento de Biología Molecular de la Facultad de Ciencias de la Universidad Autónoma de Madrid (UAM), por

Tania Calvo López

Para optar al grado de Doctor en Ciencias por la UAM, en el Programa de Doctorado de Biociencias Moleculares.

La memoria ha sido realizada bajo mi dirección en el Centro de Biología Molecular Severo Ochoa (CSIC-UAM), lo que certifico a los efectos oportunos.

Atentamente,

Catedrático de Microbiología

Universidad Autónoma de Madrid (UAM)

Facultad de Ciencias. Departamento de Biología Molecular

Centro de Biología Molecular Severo Ochoa (CSIC-UAM)

C/Nicolás Cabrera, 1, Cantoblanco 28049, Madrid (España).

DECLARACIÓN DE COMPROMISO ÉTICO Y ORIGINALIDAD
DE LA TESIS DOCTORAL

AUTOR/-A: Tania Calvo López

DIRECTOR/-A(S): José María Almendral del Río

PROGRAMA DE DOCTORADO: Biociencias Moleculares

TÍTULO: Ingeniería de dominios funcionales de la cápsida del Parvovirus MVM con péptidos que bloquean VEGF: efectos en ensamblaje, inmunogenicidad y tropismo.

Hago entrega de la citada tesis doctoral en tiempo y forma de acuerdo a la normativa vigente de la Escuela de Doctorado de la Universidad Autónoma de Madrid.

Asimismo, como autora de la citada tesis doctoral,

DECLARO:

- Que el documento responde al *Código de Buenas Prácticas en la Investigación* de Universidad Autónoma de Madrid.
- Que es un trabajo original y sin plagios, donde se han seguido los estándares internacionales de citación y normas de publicación.
- Que soy conocedora de que el incumplimiento de las declaraciones anteriores supone la anulación del título de Doctor/-a.

Del mismo modo, **ASUMO** frente a la Universidad cualquier responsabilidad que pudiera derivarse del incumplimiento del compromiso ético de la presente declaración.

Madrid, 22 de septiembre de 2021

Fdo: D./D.ª Tania Calvo López

Esta DECLARACIÓN DE COMPROMISO ÉTICO Y ORIGINALIDAD debe insertarse en la primera página de la tesis presentada para la obtención del título de Doctor

A mis padres, Lore y Adri y a Óscar

AGRADECIMIENTOS

“Cuando la gratitud es tan absoluta las palabras sobran”

Álvaro Mutis (1923-2013)

En primer lugar, me gustaría empezar agradeciéndole a Pepe la oportunidad, la confianza y el apoyo que me ha dado para poder realizar esta tesis en su laboratorio. Gracias por enseñarme tanto a nivel científico como humano a lo largo de estos cuatro años.

Agradecer a las Dras. Esther Grueso y Cristina Sánchez-Martínez por haber comenzado y asentado las bases de este trabajo. De igual forma, me gustaría dar las gracias al Dr. Germán Andrés por su colaboración desde el servicio de microscopía electrónica en el desarrollo y análisis de los ensayos correspondientes.

Le agradezco también a Benhard Barleon su ayuda desinteresada y en favor de la ciencia al proporcionar reactivos necesarios para el desarrollo de la presente tesis doctoral.

Por otro lado, me gustaría agradecer a Alberto su apoyo, ayuda y ánimo a lo largo de este tiempo. A Carlos por todas las anécdotas que me llevo, por sus ánimos y por todo lo que me ha aguantado... ¡que no ha sido poco! A Nooshin por todo su apoyo, las risas, por los momentos de confesiones y desconexión. Gracias también a todos los compañeros que han pasado por el 224 y con los que he compartido momentos a lo largo de esta etapa: Marcos, Rebeca y Luisa. Y también a Pedro al que le dejo el relevo.

Por otro lado, me gustaría agradecer y dedicar esta tesis a todas esas personas que, sin contribuir a la parte científica propiamente dicha, han hecho posible el desarrollo de esta tesis gracias a su apoyo incondicional.

A mis padres por apoyarme y escucharme siempre en cualquier momento y ante cualquier situación y por haberme permitido emprender esta aventura aquí, en Madrid. Por todo lo que me habéis enseñado y aguantado. Sin vosotros habría sido imposible llegar hasta aquí.

A Lore y Adri por animarme, apoyarme y ayudarme en todo lo que me proponga. Por su paciencia infinita y porque sé que siempre van a estar ahí.

A Óscar porque sin tu apoyo y tu ánimo habría sido imposible llegar hasta aquí. Por tu ilusión y por alegrarte por mis logros a veces incluso más que yo misma. Gracias por hacerme el día a día más fácil.

A mi familia madrileña por haberme acogido como a una más. Por todo el apoyo y los ánimos que me transmiten cada día.

A mis tíos, Mari y Ser, por sus ánimos y apoyo ante cualquier cosa que me proponga. Por las tardes de juegos y las risas. Por estar ahí.

Por último, me gustaría agradecer a Sara y Alba por todo su apoyo, por todos los momentos de risas. Espero poder seguir sumando anécdotas juntas. A Mau, por sus ánimos y por ser la mejor compañera de piso madrileña que pudiera desear. Aunque sea en la distancia sé que puedo seguir contando contigo. Y también agradecer a Lorena, la primera persona que conocí en Madrid y a la que espero verla pronto de vuelta por aquí, por su locura, su energía y por sus ánimos.

“El científico no es una persona que da las respuestas correctas, es una persona que hace las preguntas correctas”.

Claude Levi-Strauss (1908-2009)

RESUMEN / SUMMARY

Algunas de las terapias en primera línea más frecuentes contra el cáncer se basan en la administración de anticuerpos e inhibidores que bloquean la síntesis y la actividad del factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF) que promueven la neovascularización y la metástasis. En este estudio hemos intentado dirigir la cápsida del parvovirus oncolítico Minute Virus of Mice (MVM) hacia la inhibición de la vasculatura tumoral mediante la generación de anticuerpos α -VEGF y la expresión de productos citotóxicos virales en células que expresan VEGF-R1. Para ello, se reemplazaron péptidos de dominios funcionales de la cápsida del MVM (el hoyuelo en el eje de simetría 2X; la espícula en el eje 3X; y el extremo N-terminal de VP2 en el eje 5X) por tres péptidos (P6L (PQPRPL), A7R (ATWLPPR) y N6G (NIRRQG)) que bloquean la unión de VEGF a receptores.

La cápsida de las quimeras obtenidas se analizó en su tolerancia estructural y funcional, capacidad de inducir anticuerpos α -VEGF, y tropismo hacia células de glioblastoma humano. La mayoría de las sustituciones provocaron alteraciones en el ensamblaje o en la maduración del virus. Sin embargo, la quimera que portaba el péptido P6L en la espícula (eje-3X) se propagó eficazmente en cultivo exponiendo el péptido heterólogo en la superficie de la cápsida, y evadió la neutralización por un anticuerpo anti-espícula. Por el contrario, el péptido A7R en la espícula dio lugar a un ensamblaje deficiente, que se restituyó al adquirir el virus MVM-A7R en cultivo la sustitución de aminoácidos P6Q dentro de la secuencia A7R. En forma consistente, cápsidas vacías, pero no viriones MVM-A7R, indujeron anticuerpos anti-VEGF nativo en ratones.

Las quimeras que portan el péptido N6G en el hoyuelo (eje-2X), donde se localiza el sitio de unión al receptor siálico, mostraron una infectividad significativamente mayor que la del wt hacia células de glioblastoma humano, si bien no infectaron a través de VEGF-R1. Este resultado sugiere que el ensamblaje de las subunidades de la cápsida impone distorsiones estructurales en la configuración funcional de los péptidos exógenos. Por el contrario, los viriones MVM-N6G usan, como el wt, azúcares con ácido siálico para la adsorción y como receptores en la infección, a los que se unen con una afinidad comparable. La relajación de entramados de glicanos de la superficie celular con bajas dosis de neuraminidasa incrementa muy significativamente la capacidad de infección del virus MVM-N6G unido, al facilitar el procesamiento intracelular de VP2 requerido para iniciar la infección.

Este nuevo enfoque basado en el reemplazo de péptidos en dominios funcionales de cápsidas icosaédricas, proporciona una información valiosa para: (i) dotar de capacidad inmune anti-neovascularizante a virus oncolíticos; (ii) ilustrar la capacidad evolutiva de los virus de ADN monocatenario para superar restricciones estructurales de la cápsida impuestas por ingeniería genética; y (iii) manipular el tropismo de parvovirus al alterar las transiciones estructurales de la cápsida que siguen a la unión de ácidos siálicos en glicanos cuya composición es dependiente de tipo celular.

Some of the most common first-line cancer therapies are based on the administration of antibodies and inhibitors that block the synthesis and activity of the vascular endothelial growth factor (VEGF) that promote neovascularization and metastasis. In this study we have attempted to direct the capsid of the oncolytic parvovirus Minute Virus of Mice (MVM) to inhibit the tumor vasculature by raising α -VEGF antibodies and expressing viral cytotoxic products in cells expressing VEGF-R1. To do this, peptides from functional domains of the MVM capsid were replaced (the dimple on the 2X axis of symmetry; the spike on the 3X axis; and the N-terminal end of VP2 on the 5X axis) by three peptides (P6L (PQPRPL), A7R (ATWLPPR) and N6G (NIRRQG)) that block the binding of VEGF to receptors.

The capsid of the chimeras obtained was analyzed for their structural and functional tolerance, ability to induce α -VEGF antibodies, and tropism towards human glioblastoma cells. Most of the substitutions caused alterations in the assembly or maturation of the virus. However, the chimera carrying the P6L peptide on the spike (3X-axis) efficiently propagated in culture exposing the heterologous peptide on the surface of the capsid and evading neutralization by an anti-spike antibody. On the contrary, the A7R peptide in the spike gave rise to a deficient assembly, which was restored when the MVM-A7R virus acquired in culture the substitution of amino acids P6Q within the A7R sequence. In consistency, empty capsids, but no MVM-A7R virions, induced native anti-VEGF antibodies in mice.

The MVM-N6G chimeras bearing the N6G peptide in the dimple (2X-axis), where the sialic acid receptor binding site localizes, demonstrated a greater significant infectivity than the wt towards human glioblastoma cells, although it did not infect through the VEGF-R1. This result suggests that the assembly of the capsid subunits imposes structural distortions on the functional configuration of exogenous peptides. In contrast, MVM-N6G virions use, like wt, sugars with sialic acid for adsorption and as receptors in infection, to which they bind with comparable affinity. Relaxation of cell surface glycan frameworks with low doses of neuraminidase very significantly increases the infectivity of the bound MVM-N6G virus by facilitating the intracellular processing of VP2 required to initiate infection.

This new approach based on the replacement of peptides in functional domains of icosahedral capsids, provides valuable information to: (i) provide anti-neovascularizing immune capacity to oncolytic viruses; (ii) illustrate the evolutionary capacity of single-stranded DNA viruses to overcome structural capsid constraints imposed by genetic engineering; and (iii) manipulate parvovirus tropism by altering the structural transitions of the capsid after sialic acid binding in cell-type dependent glycans.

ÍNDICE

RESUMEN / SUMMARY	3
ÍNDICE	9
CLAVE DE ABREVIATURAS	17
INTRODUCCIÓN	21
1. El factor de crecimiento del endotelio vascular (VEGF).....	23
2. Tratamientos anti-VEGF de uso en clínica	24
3. Péptidos que inhiben la función del VEGF.....	25
4. Virus Oncolíticos	27
5. Virus Oncolíticos y VEGF.....	28
6. Parvovirus	29
7. AAV	29
8. El parvovirus diminuto del ratón (MVM).....	32
8.1. Características generales y cepas	32
8.2. Organización genética.....	32
8.3. Ciclo vital del MVM.....	33
8.3.1. Adsorción y entrada.....	33
8.3.2. Replicación y ensamblaje.....	35
8.4. Estructura y dominios en la cápsida del MVM.....	36
8.5. El MVM como virus oncolítico.	38
8.6. Manipulación de la cápsida del MVM con VEbp.....	39
OBJETIVOS	41
MATERIALES Y MÉTODOS	45
1. Células Eucariotas.....	47
1.1. Líneas celulares, mantenimiento y cultivo.....	47
1.2. Transfección de células NB324K	47
2. Células Procariotas.....	48
2.1. Cepas, mantenimiento y cultivo.....	48
2.2. Transformación de las células procariotas y purificación de plásmidos.....	48

Índice

3. Construcción de las quimeras MVM-VEbp.....	49
4. Protoparvovirus Diminuto del Ratón.....	49
4.1. Producción y purificación de viriones y cápsidas vacías.....	49
4.2. Ensayo de hemaglutinación.....	50
4.3. Valoración de infectividad por formación de placas de lisis (PFU).....	51
4.4. Análisis de ensamblaje de cápsidas.....	52
4.5. Análisis genético de la evolución de MVM en cultivo.....	52
5. Anticuerpos.....	53
5.1. Inmunización de ratones.....	53
5.2. Tipos de anticuerpos.....	53
5.3. Inmuno-microscopía electrónica (ME).....	55
5.4. Análisis de neutralización de virus con anticuerpos.....	55
6. Técnicas de biología celular.....	56
6.1. Inmunofluorescencia indirecta.....	56
6.2. Citometría de flujo.....	57
7. Análisis de proteínas.....	57
7.1. Aplicación directa sobre membrana (Slot blot).....	57
7.2. Western-blot.....	57
7.3. Inmunoprecipitación <i>in vitro</i> con <i>Sepharosa</i>	58
8. Tropismo del MVMp y de virus quiméricos.....	58
9. Análisis del uso de VEGFR-1 en la unión de virus quiméricos.....	59
10. Análisis del ácido siálico en la unión e infección del MVMp y de la quimera Nd.....	60
11. Cinética de unión del MVMp y de la quimera Nd a células NB324K.....	60
12. Procesamiento VP2 / VP3 durante la entrada de MVMp y de Nd y su modulación por neuraminidasa.....	61
RESULTADOS.....	63
1. Tolerancia funcional de la cápsida del MVMp a dos VEbp que sustituyen residuos de la espícula (eje de simetría 3X).....	65

1.1. Virus quiméricos MVM-VEbp que poseen los péptidos A y P insertados en la espícula.	65
1.2. Impacto de los VEbp heterólogos en el ciclo vital del MVM.....	66
1.3. Efecto del péptido A7R insertado en el eje 3X sobre el ensamblaje de la cápsida del MVM.....	68
2. Exposición de los VEbp en la superficie de la cápsida del MVM.	70
2.1. Análisis de la configuración de los VEbp en la superficie de cápsidas quiméricas.....	70
2.2. Resistencia a la neutralización por anticuerpos específicos de los virus quiméricos MVM-VEbp.....	72
2.3. Inmunogenicidad en ratón de los péptidos presentados en cápsidas quiméricas MVM-VEbp.....	73
2.4. Estabilidad genética del péptido A7R en el virus MVM quimérico.	74
3. Tolerancia funcional de la cápsida del MVMp a VEbp que sustituyen residuos de la espícula y del hoyuelo.	77
3.1. Efectos fenotípicos de los VEbp insertados en tres dominios funcionales de la cápsida.....	77
3.2. Impacto de la inserción de VEbp sustituyendo residuos del hoyuelo y de la espícula sobre la infectividad específica.	79
3.3. El péptido N insertado en el hoyuelo incrementa el tropismo del parvovirus MVMp hacia células de glioblastoma humano.	82
4. Análisis del uso de receptores por los virus quiméricos MVM-VEbp.....	84
4.1. La infección de los virus quiméricos VEbp-MVM no está relacionada con la unión a VEGFR-1.....	84
4.2. Los viriones wtMVM y Nd difieren en el uso de ácidos siálicos para la unión e infección de células transformadas humanas.	85
4.3. Efecto de la unión a ácido siálico en la entrada de los viriones wtMVM y Nd.	90
DISCUSIÓN.....	93
Virus quiméricos MVM-VEbp pueden ensamblarse y ser infecciosos.....	95
Interacción inmune de las quimeras MVM-VEbp.....	96
La evolución de parvovirus puede modificar péptidos heterólogos.....	98
Manipulando el tropismo del MVM.....	98
El ácido siálico en la unión productiva y no productiva de wtMVM y quimeras-VEbp.....	100

Índice

Comentarios finales.....	102
CONCLUSIONES.....	103
BIBLIOGRAFÍA.....	107
ANEXOS.....	123

Figura 1. Implicación del VEGF en el desarrollo y proliferación tumoral.....	23
Figura 2. Péptidos heterólogos que bloquean la unión de VEGF (VEbp) a sus receptores y correceptores.	26
Figura 3. Mecanismos implicados en la entrada del MVMp.....	34
Figura 4. Ciclo vital del MVMp.....	35
Figura 5. Cápsida del MVM con detalle de los dominios poro (5X), espícula (3X) y hoyuelo (2X). ..	36
Figura 6. Estructura del hoyuelo y del poro de la cápsida del MVMp.....	37
Figura 7. Ingeniería genética de la espícula de la cápsida del MVM con VEbp.....	65
Figura 8. Impacto de VEbp en el ciclo viral infeccioso del MVM.	67
Figura 9. Patrón de ensamblaje del virus quimérico MVM-A7R.....	69
Figura 10. Reconocimiento por anticuerpos de los VEbp en las cápsidas quiméricas.....	71
Figura 11. Evasión de las quimeras MVM-VEbp de la neutralización por anticuerpos específicos.....	73
Figura 12. Inmunogenicidad de los VEbp presentados en cápsidas quiméricas.	74
Figura 13. Estabilidad genética de las quimeras MVM-VEbp.....	75
Figura 14. Patrón de ensamblaje de las cápsidas vacías quiméricas.	76
Figura 15. Ilustración de la inserción o sustitución de residuos en tres dominios de la cápsida del MVM por péptidos que bloquean VEGF.	78
Figura 16. Capacidad hemaglutinante de los viriones quiméricos MVM-VEbp.....	80
Figura 17. Morfología de placa e infectividad específica de los viriones quiméricos MVM-VEbp.....	81
Figura 18. Evasión de neutralización de viriones quiméricos MVM-VEbp.	82
Figura 19. Efecto del péptido N insertado en el hoyuelo sobre el tropismo del MVM hacia células de glioblastoma humano.	83
Figura 20. Análisis del uso de VEGFR-1 para la unión e infección del MVMp y del virus quimérico Nd.	85
Figura 21. Papel del ácido siálico en la unión e infección de wt y Nd en fibroblastos NB324K.....	87
Figura 22. Análisis citométrico del uso de ácidos siálicos por los virus wt y Nd en la infección de células NB324K.	88
Figura 23. Papel del ácido siálico en la unión e infección de los virus wt y Nd en células U373MG.....	89
Figura 24. Análisis de afinidad y entrada del MVMwt y la quimera Nd en células NB324K.	91
Figura 25. Modelos hipotéticos sobre el uso de receptores de ácido siálico por MVMp y la quimera MVM-Nd.....	101

Índice de tablas

Tabla I. Modificaciones genéticas de la cápsida del AAV que alteran tropismo.	30
Tabla II. Unión de AAV modificado por inserciones de péptidos al receptor al que van dirigidos.....	31
Tabla III. Fenotipo de los viriones quiméricos VEbp-MVMp	79

CLAVE DE ABREVIATURAS

2X	Hoyuelo / eje 2X de la cápsida del MVM
3X	Espícula / eje 3X de la cápsida del MVM
5X	Poros / eje 5X de la cápsida del MVM
A7R / A	Péptido que contiene la secuencia ATWLPPR
AADC	Aminoácido L-descarboxilasa
AAV	Virus adenoasociados (del inglés, <i>Adeno-associated Virus</i>)
Ad	Quimera del MVM que contiene el péptido A7R en el hoyuelo
ADN	Ácido desoxirribonucleico
ADNbs	ADN de banda sencilla
ADNdb	ADN de doble banda
As	Quimera del MVM que contiene el péptido A7R en la espícula
BALB/c	Cepa albina de ratón <i>Mus musculus</i>
BPV	Parvovirus bovino (del inglés, <i>Bovine Parvovirus</i>)
BSA	Albúmina de suero bovino (del inglés, <i>Bovine Serum Albumin</i>)
CBMSO	Centro de Biología Molecular Severo Ochoa
cRGD	Péptido cíclico de arginina-glicina-aspártico
DAB	3,3'-diaminobenzidina tetrahidrocloruro
DAPI	4',6-diamidino-2-fenilindol
DMEM	Medio de Eagle modificado por Dulbecco (del inglés, <i>Dulbecco's Modified Eagle's Medium</i>)
DO	Densidad óptica
dpt	Días post-transfección
E. coli	<i>Escherichia coli</i>
ECL	Quimioluminiscencia mejorada (del inglés, <i>Enhanced Chemiluminescence</i>)
EDTA	Ácido etilendiaminetetraacético (del inglés, <i>Ethylenediaminetetraacetic Acid</i>)
EGF	Factor de crecimiento epidérmico (del inglés, <i>Epidermal Growth Factor</i>)
FACS	Citometría preparativa de células activadas por fluorescencia (del inglés, <i>Fluorescence-activated cell sorting</i>)

Clave de abreviaturas

FBS	Suero fetal bovino (del inglés, <i>Fetal Bovine Serum</i>)
Fc	Fragmento cristalizable
FDA	Administración de medicamentos y alimentos de Estados Unidos (del inglés, <i>U.S. Food and Drug Administration</i>)
FGF	Factor de crecimiento de fibroblastos (del inglés, <i>fibroblast growth factor</i>)
FITC	IgG conjugada con isotiocianato de fluoresceína
Flt1 / VEGFR-1	Receptor 1 del VEGF
FSC	Dispersión frontal
GM-CSF	Factor estimulante de colonias de monocitos y granulocitos (del inglés, <i>Granulocyte Macrophage Colony-Stimulating Factor</i>)
H-1PV	Parvovirus de roedores H-1.
HA	Hemaglutinación
HCl	Ácido clorhídrico
HEPES	Ácido 4-(2-hidroxietil) piperazin-1-iletanosulfónico (del inglés, <i>4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid</i>)
HGPRT-	Hipoxantina-guanina-fosforribosil-transferasa negativo
hpi	Horas post-infección
hpt	Horas post-transfección
IF	Inmunofluorescencia
IFN	Interferón
Ig	Inmunoglobulina
IL-1	Interleuquina 1
ITR	Repeticiones terminales invertidas
KDR / Flk-1 / VEGFR-2	Receptor 2 del VEGF
KLP	Hemocianina de lapa californiana
LD	Límite de detección
LH-R	Receptor de la hormona luteinizante (del inglés, <i>Luteinizing Hormone Receptor</i>)
LM-GCT	Rojo fenilo en agarosa de bajo punto de gelificación
mAb	Anticuerpo monoclonal (del inglés, <i>Monoclonal antibody</i>)
ME	Microscopía electrónica

MOI	Multiplicidad de infección (del inglés, <i>Multiplicity of Infection</i>)
MVM	Virus diminuto de ratón (del inglés, <i>Minute Virus of Mice</i>)
MVMp	Virus diminuto de ratón, cepa “prototipo” (p) (del inglés, <i>Minute Virus of Mice “prototype” (p) strain</i>)
MVMi	Virus diminuto de ratón, cepa “inmunosupresora” (i) (del inglés, <i>Minute Virus of Mice “immunosuppressive” (i) strain</i>)
N6G / N	Péptido que contiene la secuencia NIRRQG
NA	Neuraminidasa
Nd	Quimera del MVM que contiene el péptido N6G en el hoyuelo
NdPs	Quimera del MVM que contiene el péptido N6G en el hoyuelo y el péptido P6L en la espícula
NES	Secuencia de exportación nuclear
NLM	Motivo de localización nuclear
NLS	Secuencia de localización nuclear
NPC	Complejo del poro nuclear
NP40	Nonidet P40
NRP	Neuropilina
NS o Rep	Proteína no estructural (del inglés, <i>Non-structural proteins</i>)
nu	No unido
P6L / P	Péptido que contiene la secuencia PQRPL
PAGE	Electroforesis en gel de poliacrilamida
PBS	Solución salina tamponada con fosfato
PBS⁺⁺	Solución salina tamponada con fosfato y con CaCl ₂ y MgCl ₂
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
PDGF	Factor de crecimiento derivado de plaquetas (del inglés, <i>Platelet Derived Growth Factor</i>)
PD-L1 / PD-1	Ligando 1 de muerte programada (del inglés, <i>Programmed Death-Ligand 1</i>)
PFA	Paraformaldehído
PFU	Unidades formadoras de placas (del inglés, <i>Plaque Forming Unit</i>)
PIGF	Factor de crecimiento placentario (del inglés, <i>Placental Growth Factor</i>)
PMSF	Fluoruro de fenilmetilsulfonilo (del inglés, <i>Phenylmethylsulfonyl Fluoride</i>)

Clave de abreviaturas

pMVM	Plásmido del MVM
Ps	Quimera del MVM que contiene el péptido P6L en la espícula
RF	Forma replicativa (del inglés, <i>Replicative Form</i>)
RGD	Péptido de arginina-glicina-aspartico
SCID	Inmunodeficiencia combinada severa
SDS	Dodecil sulfato sódico
SF3	Superfamilia de la helicasa 3
sia	Ácido siálico (del inglés, <i>Sialic Acid</i>)
SSC	Dispersión lateral
SV40	Virus del Simio 40 Vacuolizante (del inglés, <i>Simian Vacuolating Virus 40</i>)
sVEGF-R1 / sVER	Receptor 1 soluble del VEGF
TBS	Tampón tris con NaCl
TBS-T	Tampón tris con NaCl y Tween 20
TGF	Factor transformador del crecimiento
TNF	Factor de necrosis tumoral (del inglés, <i>Tumor Necrosis Factor</i>)
TPCK	Tosilsulfonilfenilalanil clorometilcetona
Tris	tris(hidroximetil)aminometano
T-VEC	<i>Talimogene laherparepvec</i>
TXRD	Texas Red
u	Unido
u.a.	Unidades arbitrarias
UHA	Unidades de hemaglutinación
UIF	Unidades formadoras de inmunofluorescencia
VEbp	Péptidos que bloquean la unión del VEGF con sus receptores (del inglés, <i>VEGF blocking peptides</i>)
VEGF	Factor de crecimiento endotelial vascular (del inglés, <i>Vascular Endothelial Growth Factor</i>)
VP	Proteína de la cápsida del virus (del inglés, <i>Virus Proteins</i>)
wt	Cepa salvaje (del inglés, <i>wild type</i>)

INTRODUCCIÓN

1. El factor de crecimiento del endotelio vascular (VEGF)

La neo-angiogénesis es la formación de nuevos vasos sanguíneos a partir de otros ya existentes que ocurre de forma natural en el organismo (como durante el desarrollo embrionario y posnatal, en el ciclo reproductivo femenino, o en la reparación de heridas), aunque también está implicada en distintos procesos patológicos incluyendo de forma muy significativa la progresión tumoral (ver Figura 1). Uno de los principales factores implicados en el proceso de la neo-angiogénesis, tanto en condiciones normales como patológicas, es el VEGF o factor de crecimiento endotelial vascular (Appelmann et al. 2010; Carmeliet 2005; Ferrara et al. 2007).

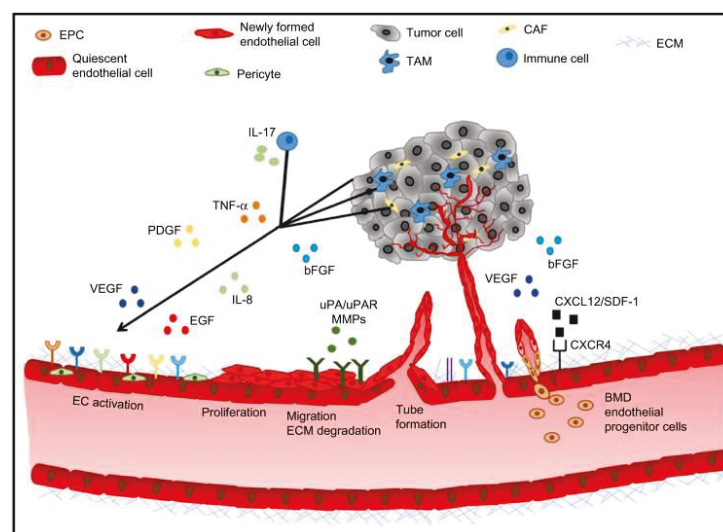


Figura 1. Implicación del VEGF en el desarrollo y proliferación tumoral. (Toro Bejarano et al. 2015)

El VEGF es una familia de factores que incluye al VEGF-A, VEGF-B, VEGF-C, VEGF-D, VEGF-E y PlGF (factor de crecimiento derivado de la placenta). El gen VEGF se encuentra positivamente regulado por factores diversos, tales como el derivado de plaquetas (PDGF), el de crecimiento de fibroblastos (FGF), el de crecimiento epidérmico (EGF), de necrosis tumoral (TNF), el transformador del crecimiento (TGF), o la interleuquina-1 (IL-1), así como por hipoxia, acidosis y algunas mutaciones oncogénicas (Apte et al. 2019; Carmeliet 2005). El VEGF-A (que a partir de ahora llamamos simplemente VEGF) es un homodímero de 45 kDa que presenta distintas isoformas, identificables por el número de aminoácidos que contienen (121, 145, 165, 183, 189 y 206), resultado del corte y empalme alternativo de los transcritos de un único gen formado por ocho exones y localizado en el cromosoma 6p21.3 (Appelmann et al. 2010; Apte et al. 2019; Carmeliet 2005; Ferrara et al. 2007).

Todas las isoformas inducen permeabilidad vascular, las más cortas poseen actividad mitógena (Appelmann et al. 2010), y algunas unen heparina, por ejemplo la VEGF₁₆₅ (VEGF nativo) que posee un dominio de unión a heparina y se une además a la matriz extracelular, actividad de elevada

importancia fisiológica (Appelmann et al. 2010; Apte et al. 2019; Carmeliet 2005; Ferrara et al. 2007). Además de la angiogénesis, VEGF induce proliferación, migración, invasión, permeabilidad vascular, quimiotaxis y liberación de factores anti-apoptóticos (Apte et al. 2019; Carmeliet 2005; Ferrara et al. 2007; Smith et al. 2014). De estas funciones deriva la importancia del VEGF en la progresión tumoral y en el desarrollo de otras enfermedades también dependientes de neo-angiogénesis, como la enfermedad de las arterias coronarias, la retinopatía diabética, o la artritis (Matsumoto et al. 2014).

Los receptores de VEGF son las tirosina quinasa VEGFR-1 (Flt1) y VEGFR-2 (KDR/Flk-1) encargados de transducir las señales de migración celular y mitóticas, junto con los co-receptores de las Neuropilinas (NRP-1 y NRP-2) que aumentan la afinidad de unión del VEGF al VEGFR-1, aunque también pueden transducir señales de forma independiente (Appelmann et al. 2010; Carmeliet 2005; Ferrara et al. 2007; Matsumoto et al. 2014). VEGFR-1 (1338 aa) y VEGFR-2 (1356 aa) se expresan principalmente en células endoteliales, aunque también en vasos linfáticos (VEGFR-2) y células del músculo liso, fibroblastos, progenitores mieloides o macrófagos (VEGFR-1) (Appelmann et al. 2010; Carmeliet 2005; Itatani et al. 2018). Ambos receptores poseen una región carboxilo terminal con actividad tirosina quinasa, otra transmembrana, y una extracelular con siete dominios de unión a inmunoglobulinas (Ig) donde se une VEGF, al primer dominio en el caso del VEGFR-1 y al segundo/tercer dominio en el caso del VEGFR-2 (Appelmann et al. 2010), siendo esta la principal vía de señalización del VEGF (Smith et al. 2014). VEGF se une con una mayor afinidad a VEGFR-1, que en su forma soluble (sVER1) carece de dominios quinasa intracelulares, y puede además heterodimerizar con VEGFR-2 bloqueándolo (Carmeliet 2005). VEGFR-2 dimeriza y se fosforila al unir VEGF (Ferrara et al. 2007), que en condiciones tumorales se expresa a niveles varias veces superiores a las fisiológicas.

2. Tratamientos anti-VEGF de uso en clínica

Dada la importancia del VEGF en el desarrollo de muchos tumores sólidos -como el de mama, pulmón, páncreas, ovario, colorrectal, carcinoma de riñón y de vejiga- este factor es objetivo prioritario para el desarrollo de nuevos tratamientos contra el crecimiento y proliferación tumoral (Appelmann et al. 2010; Ferrara et al. 2007; Matsumoto et al. 2014).

Uno de los tratamientos más utilizados es el bevacizumab (Avastin), un anticuerpo monoclonal recombinante humanizado específico anti-VEGF-A, aprobado en 2004 por la FDA (Administración de medicamentos y alimentos de Estados Unidos) para el tratamiento del cáncer colorrectal metastásico. A partir de aquí, siguieron aprobaciones para su empleo en neoplasias diversas como el carcinoma de pulmón no microcítico no escamoso, carcinoma de células renales, glioblastoma multiforme, cáncer de ovario, o cáncer de cuello uterino (Apte et al. 2019; Ferrara et al. 2007; Itatani et al. 2018;

Matsumoto et al. 2014; Smith et al. 2014). Otro tratamiento frecuente es el aflibercepto (Zaltrap), una proteína recombinantes con los dominios extracelulares de VEGFR-1 y VEGFR-2 fusionados a la porción Fc de la inmunoglobulina IgG1 humana, que neutralizan al VEGF-A, VEGF-B y al PlGF (Apte, Chen, and Ferrara 2019; Itatani et al. 2018; Smith et al. 2014), aprobado por la FDA en 2012 como segunda línea en cáncer colorrectal metastásico. Los anticuerpos monoclonales que unen VEGFR-2 como el Ramucirumab (Cyramza), e inhibidores de los receptores tirosina quinasa (como el Sunitib (Sutent), el Sorafenib (Nexavar), el Pazopanib (Votrient) o el Vandetanib), son también tratamientos aprobados por la FDA para su uso contra distintos tumores sólidos (Ferrara et al. 2007; Itatani et al. 2018; Smith et al. 2014).

Además de ciertos efectos adversos, la limitación principal de estos fármacos es la heterogeneidad de la vasculatura tumoral, por lo que el tratamiento contra VEGF puede llegar a inducir una transición mesenquimatosas, o una mayor resistencia a la quimioterapia (Ferrara et al. 2007; Smith et al. 2014). Es por ello que el bevacizumab o el ramucirumab han mostrado una mayor eficacia al administrarse en combinación con quimio y/o radioterapia (Apte et al. 2019; Ferrara et al. 2007; Itatani et al. 2018; Matsumoto et al. 2014; Smith et al. 2014). Además, se debe destacar cómo en los últimos años la inmunoterapia ha cobrado gran importancia en el tratamiento del cáncer. Por ejemplo el atezolizumab, un anticuerpo que bloquea el PD-L1/PD-1 (molécula que interacciona con el VEGF), ha mostrado eficacia antitumoral en combinación con otros que inhiben directamente el VEGF, como el bevacizumab (Apte et al. 2019). Sin embargo, la eficacia de este tipo de tratamiento se ve restringida a una parte de la población tratada, sin que por el momento se conozcan las bases de esta limitación.

3. Péptidos que inhiben la función del VEGF

Se han identificado péptidos heterólogos muy diversos con capacidad para inhibir la señalización de VEGF y sus funciones de inducción de neo-angiogénesis y de crecimiento celular (Vicari et al. 2011). Entre ellos se encuentran los péptidos siguientes de unión a receptores de VEGF utilizados en este trabajo (ver Figura 2):

A7R (ATWLPPR). – Heptapéptido identificado y seleccionado a través de una genoteca de fagos con un anticuerpo anti-VEGF que bloquea la proliferación de células epiteliales dependiente de VEGF₁₆₅ (Binétruy-Tournaire et al. 2000). A7R se une directamente al receptor neuropilina-1 (NRP-1), lo que altera el complejo que forma con el receptor KDR e interrumpe así el efecto mitogénico dependiente de KDR (Starzec et al. 2006). Esta unión con NRP-1 produce también una disminución tanto de la proliferación de células epiteliales mediada por VEGF, como de la formación tubular (angiogénesis) que alteraría el complejo formado con el receptor KDR interrumpiendo así, el efecto mitogénico

Introducción

dependiente de KDR. Esta unión con NRP-1 produce también una disminución tanto de la proliferación células epiteliales mediada por VEGF como de la formación tubular en matrigel y en cocultivos con fibroblastos (Binétruy-Tournaire et al. 2000; Starzec et al. 2006).

P6L (PQPRPL). – Péptido seleccionado por el método denominado BRASIL, que consiste en una selección por afinidad de ligandos interactivos a través de una centrifugación diferencial en ambiente no miscible, que permite la separación del complejo formado por los fagos que presentan péptidos aleatorios y las células epiteliales estimuladas con VEGF₁₆₅ (Giordano et al. 2001). P6L contiene en su secuencia zonas superpuestas de unión de dos isoformas de VEGF-B (VEGF-B₁₆₇ y VEGF-B₁₈₆) con NRP-1. Este péptido P6L se une tanto al VEGFR-1 como a la NRP-1 siendo hasta cien veces más eficaz en el bloqueo de la unión de fagos que se unen al receptor VEGFR-1 (Giordano et al. 2001). Si bien el péptido RPL, contenido en la secuencia de P6L, presenta una mayor afinidad de unión por el receptor NRP-1 (Giordano et al. 2010). Es de destacar que las terapias combinadas que se dirigen a VEGFR-1 y a la neuropilina-1 tienen efectos aditivos en la reducción del crecimiento tumoral (Pan et al. 2007).

N6G (NIRRQG). – Este péptido se seleccionó siguiendo el mismo método que el empleado para el péptido P6L. Únicamente se estudió y se validó su unión con el receptor VEGFR-1, aunque la unión P6L-VEGFR-1 es más eficaz que N6G-VEGFR-1 (Giordano et al. 2001).

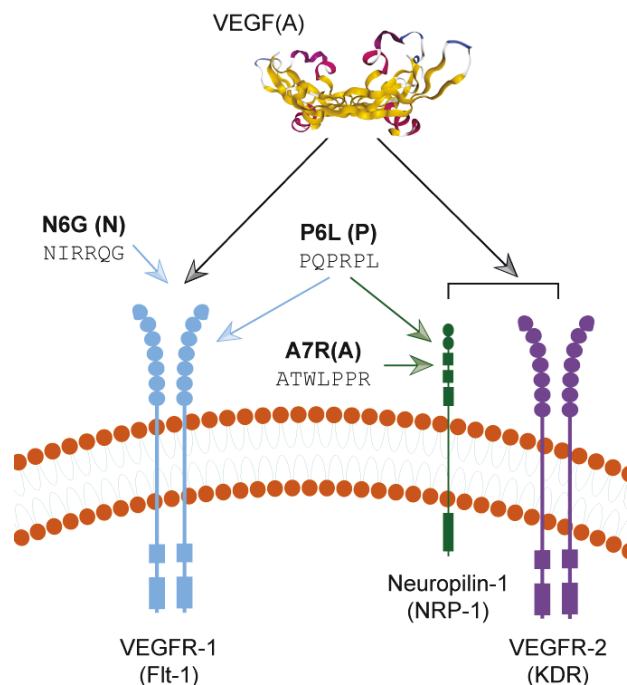


Figura 2. Péptidos heterólogos que bloquean la unión de VEGF (VEbp) a sus receptores y correceptores. Arriba; Estructura del VEGF-A (o VEGF) del banco de datos de proteínas (PDB: 1VPF). Abajo: Secuencia, acrónimo y modelo esquemático de los puntos de acción de los VEbp.

4. Virus Oncolíticos

El empleo de virus en tratamientos oncolíticos no es algo actual, sino que se remonta a la década de 1990 cuando se hicieron las primeras aproximaciones experimentales, aunque con una potencia y una eficacia que resultaron insuficientes (Liu et al. 2008). Se define como virus oncolíticos aquellos que infectan de forma preferente y en modo lítico células tumorales. Una de las principales ventajas del uso de virus en el tratamiento oncolítico es que en ocasiones la infección se beneficia de algunas de las características de los tumores, por ejemplo, en los casos en que: (i) el virus usa receptores que se encuentran sobre-expresados en cáncer; (ii) los tumores desarrollan cambios genéticos y expresan antígenos tumorales que facilitan la infección; (iii) en la progresión tumoral se altera de la expresión de proteínas supresoras de tumores que facilita la infección (Rhim et al. 2007; Tomita et al. 2019). Ahora bien, una de las principales limitaciones para el uso de virus oncolíticos es la inmunidad innata y adaptativa del huésped, que puede limitar la oncolisis y la propagación del virus dentro del tejido tumoral (Rhim et al. 2007).

Son ya muy diversos los virus oncolíticos sobre los que se tiene información abundante y han sido ensayados en clínica, entre los que destacan el herpes simple, poxvirus vaccinia, reovirus, adenovirus y algunos parvovirus (Adelfinger et al. 2014; Glaß et al. 2008; Rhim et al. 2007). Desde 2005, se encuentra aprobado el uso clínico del adenovirus oncolítico H101 para el tratamiento de pacientes con cáncer de cabeza y cuello en China (Adelfinger et al. 2014), y en 2015 la Administración de Medicamentos y Alimentos (FDA, por sus siglas en inglés *Food and Drug Administration*) de EE.UU. aprobó el uso del virus oncolítico talimogén laherparepvec (T-VEC), un herpes simple modificado, para tratar etapas tardías de melanoma (Johnson et al. 2015). Un ejemplo destacado es el poxvirus manipulado JX-594 (Liu et al. 2008), que expresa el factor estimulante de colonias de monocitos y granulocitos (GM-CSF) en sustitución de la timidina quinasa viral, que en ensayos clínicos indujo una disminución del flujo sanguíneo de tumor avanzado de hígado al disminuir el VEGF circulante. Otro ejemplo ya clásico de virus oncolíticos son los adenovirus, que han sido manipulados y ensayados en numerosos estudios en los que se han adaptado para su uso como vectores oncolíticos y en terapia génica. Una de las principales modificaciones consiste en generar mutantes de los genes E1A y/o E1B de forma que se aumenta la replicación y el tropismo viral hacia células tumorales (Choi et al. 2015; Kang et al. 2008; Lam et al. 2004; Saito et al. 2006; Zheng et al. 2009).

Por su importancia en este estudio, los virus de la familia *Parvoviridae*, cuyas características genéricas se describen más abajo, merecen ser destacados como virus anti-cáncer. La actividad oncolítica de los Parvovirus invariablemente requiere división celular. Un ejemplo bien estudiado es el parvovirus H-1 (H-1PV), que es de origen de rata, pero que también infecta células humanas de diversos orígenes (por ejemplo, cerebro, páncreas, sangre, colon, cuello uterino y mama). El H-1PV se ha utilizado

en ensayos clínicos para el tratamiento del carcinoma ductal de páncreas y en pacientes con sarcoma de Ewing, aunque por ahora con poco éxito. Otro ensayo importante con este virus frente glioblastoma llegó a fase Ib / II con 18 pacientes pre-tratados (quirúrgicos, radioterapia, quimioterapia (temozolomida) y bevacizumab). Los pacientes tratados mostraron una supervivencia general y progresión comparable con la evolución natural del glioblastoma recurrente, sin efectos secundarios graves. En la mitad de los pacientes no se pudo encontrar ADN viral en el tumor, lo que podría indicar una dosis de virus insuficientes (Geletneky et al. 2017). Actualmente diez entidades diferentes están dirigiendo estudios preclínicos utilizando H-1PV (Marchini et al. 2015).

Otro Parvovirus que ha llegado a ensayos clínicos es el Virus Adeno-asociado (AAV), que infectan de forma natural a humanos sin causar patología conocida. Se conocen once tipos de AAV, que muestran diferentes especificidades celulares en función del receptor utilizado para la entrada a la célula. A diferencia del H-1PV, los AAV no son líticos y su aplicación en el tratamiento del cáncer se basa en la expresión de genes exógenos como vector, si bien la infección inicial no se puede propagar (Santiago-Ortiz and Schaffer 2016). Por ejemplo, se han usado AAV como vectores de genes para inhibir la angiogénesis, como endostatina, angiostatina, trombospondina-1, o vasostatina, principalmente en modelos de ratón de tumor de cáncer de vejiga, cáncer de ovario, cáncer de células hepáticas, cáncer de pulmón de células pequeñas y glioblastoma. En ocasiones se observó una reducción del tamaño del tumor, progresión más lenta, y un notable aumento en las tasas de supervivencia.

5. Virus Oncolíticos y VEGF

Diversos virus oncolíticos han sido dirigidos contra VEGF a partir de distintas estrategias que persiguen la inhibición de la angiogénesis, o como factores anti-tumorales genéricos. Destacan aquellas en las que se han empleado vectores de distintas familias de virus, tales como: (i) el parvovirus adenoasociado AAV2, que expresa el receptor soluble modificado Flt-01 (MacLachlan et al. 2011); (ii) adenovirus modificados que expresan los receptores solubles VEGF Flk-1 y Flt-1 (Bazan-Peregrino et al. 2013; Thorne et al. 2006) o como represores transcripcionales del promotor de VEGF (Kang et al. 2008); (iii) vectores de adenovirus y vaccinia recombinantes que expresan anticuerpos anti-VEGF (Adelfinger et al. 2014; Frentzen et al. 2009; Huang et al. 2015; Marino et al. 2017; Patil et al. 2012); (iv) herpes simple de tipo I como vector armado con vasculostatina (Tomita et al. 2019) o utilizado en combinación con anticuerpos anti-VEGF como el bevacizumab (Currier et al. 2013); y (v) parvovirus H-1PV o adenovirus como vectores de quimioquinas, entre otros, que llevan a la reducción de la proliferación tumoral e inhibición de la expresión del VEGF (Lavie et al. 2013; Liu et al. 2017). Sin embargo, aunque se han descrito modificaciones estructurales de la cápsida de AAV que afectan a

diferentes residuos, o la recubren con polímeros sensibles al pH intentando mejorar el tropismo hacia células tumorales (Choi et al. 2015; Mao et al. 2018; Moon et al. 2015), no se han descrito modificaciones de cápsidas icosaédricas de virus oncolíticos que vayan dirigidas específicamente contra el VEGF.

6. Parvovirus

La familia *Parvoviridae* está conformada por un amplio y diverso grupo de virus aislados o secuenciados de tejidos, secreciones, o excreciones de múltiples huéspedes vertebrados e invertebrados (Cotmore et al. 2014; Grekova et al. 2010; Péntzes et al. 2020). Los virus que se clasifican dentro de esta familia son virus de pequeño tamaño (23-28 nm de diámetro) que presentan una cápsida icosaédrica sin envuelta y con una disposición de subunidades en simetría T1. Su genoma es de ADN monocatenario lineal entre 4-6 kb de longitud y está flanqueado por repeticiones terminales invertidas (ITR) con una estructura secundaria en forma de horquilla. El genoma de los parvovirus codifica para proteínas no estructurales (NS o Rep) y estructurales (VP1 a VP3) (Cotmore et al. 2014; Cotmore et al. 2019; Péntzes et al. 2020).

Los virus de la familia *Parvoviridae* se clasifican a su vez en tres subfamilias las cuales se diferencian por el tipo de organismo al que infectan. Así, encontramos a la subfamilia *Parvovirinae* que infecta vertebrados, la *Densovirinae* que infecta invertebrados y *Hamaparvovirinae* que infecta tanto vertebrados como invertebrados (Péntzes et al. 2020). Dentro del amplio rango de organismos hospedadores de los parvovirus se encuentran los humanos, que son infectados por el Erythroparvovirus B19 (B19), el Bocaparvovirus (HBoV), el Tetraparvovirus 4 (PARV4) o el Bufavirus (BuPV) (Kailasan et al. 2015).

Ahora bien, no todas las infecciones por Parvovirus generan la misma sintomatología, sino que ésta puede ir desde síntomas subclínicos o no patogénicos hasta síntomas graves y letales. Esta gran diversidad en los síntomas depende del organismo huésped, del tropismo celular, y de los receptores que se usan para iniciar la infección, entre otros factores (Kailasan et al. 2015).

7. AAV

Dentro de la familia *Parvoviridae*, uno de los virus principales más estudiados por su capacidad en terapia génica humana son los AAV (Virus Adenoasociado a Adenovirus) que pertenecen al género Dependovirus (Liu et al. 2020). La importancia de los AAV para la terapia génica reside en su expresión

Introducción

génica estable, eficiente y duradera, así como en su no patogenicidad para humanos, lo que avala su bioseguridad (Büning et al. 2019; Liu et al. 2020). Sin embargo, estos virus presentan limitaciones para su uso en terapia génica como (i) un amplio tropismo, debido a la abundancia de receptores de AAV en el cuerpo humano; (ii) presencia frecuente de anticuerpos neutralizantes en la población humana; y (iii) limitaciones en el tamaño del gen exógeno que puede ser empaquetado en la cápsida (Castle et al. 2016; Liu et al. 2020).

Es por ello que gran parte del estudio de estos virus se ha centrado en modificar la cápsida para construir vectores que presenten alterados su tropismo tisular o perfil antigénico, lo que ha generado un inmenso abanico de vectores con distintas propiedades y aplicaciones en terapia génica (Castle et al. 2016; Liu et al. 2020). En la Tabla I se recogen algunos tipos de modificaciones principales utilizados para modificar la cápsida de los AAV (Büning et al. 2019; Castle et al. 2016; Liu et al. 2020).

Tabla I. Modificaciones genéticas de la cápsida del AAV que alteran tropismo.

Tipos de modificaciones	Ejemplos
<p style="text-align: center;">DISEÑO RACIONAL</p> <p>Selección de ligandos mediante presentación de fagos y su inserción, por medio de mutagénesis dirigida, en la cápsida.</p>	<p>(Davis et al. 2015; Frederick et al. 2020; Muik et al. 2017; Münch et al. 2013; Yang et al. 2019)</p>
<p>EVOLUCIÓN DIRIGIDA</p> <p>Obtención de grandes librerías de genomas para seleccionar, por presiones selectivas, variantes con propiedades específicas.</p>	<p style="text-align: center;">Modificaciones químicas</p> <p>Introducir mutaciones aleatorias por PCR o por inserción de péptidos aleatorios.</p> <hr/> <p style="text-align: center;">Vectores híbridos</p> <p>Combinar propiedades mediante expresión o recombinación genética de distintos serotipos por medio de PCR.</p>
	<p>(Davidsson et al. 2019; Deverman et al. 2016; Körbelin et al. 2016; Sallach et al. 2014; Tabebordbar et al. 2021; Varadi et al. 2012)</p> <p>(Asuri et al. 2012; Grimm et al. 2008; Klimczak et al. 2009; Koerber et al. 2008; Maguire et al. 2010)</p>

Sin embargo, la inserción de péptidos específicos seleccionados por medio de diseño racional no siempre conduce a una unión o a una transducción más eficiente en células determinadas (Büning et al. 2019; Castle et al. 2016). De hecho son muy pocos los estudios que demuestran una interacción eficaz

entre un péptido insertado en la cápsida de AAV y su receptor celular. Algunos de los estudios más elaborados se recogen en la Tabla II.

Tabla II. Unión de AAV modificado por inserciones de péptidos al receptor al que van dirigidos.

Referencia	Péptido insertado	Región de la inserción	Receptores de unión a
(Yang et al. 1998)	Región variable del fragmento monocatenario de un anticuerpo monoclonal contra CD34.	Extremo 5' de VP2	CD34
(Girod et al. 1999)	QAGTFALRGDNPQG (L14)	Posición I-587 del gen <i>cap</i> (eje 3X de la cápsida).	Integrina
(Shi et al. 2001)	TGHCSTCYYHKSGLS	A139	Hormona luteinizante (LH-R)
(Shi et al. 2003)	TGCDRCRGDCFC	A588	Integrina
(Shi et al. 2006)	TGCDRCRGDCFC//ASCDCRGDCFC	A520//N584	Integrina
(Jackson et al. 2020)	GSLDESFYDWFERQLG (S519)	Región VIII del gen <i>cap</i> .	Insulina

Gracias a estas modificaciones, se han podido desarrollar terapias génicas muy distintas y eficaces como los tratamientos: Luxturna (vector AAV2 que expresa la proteína RPE65 del epitelio pigmentario de la retina para el tratamiento de la distrofia retiniana) aprobado por la FDA (administración de medicamentos y alimentos de EE.UU.) en 2017; Zolgensma (tratamiento contra la atrofia de la médula espinal) aprobado por la FDA en 2019; y Glybera (vector AAV1 para el tratamiento contra la deficiencia de la lipoproteína lipasa) aprobado en Europa en 2012 (Büning et al. 2019; Liu et al. 2020). Además, se han probado la eficacia de vectores AAV2 en el tratamiento de: amaurosis congénica de Leber (LCA), de la deficiencia aromática del aminoácido L-descarboxilasa (AADC), y de la coroideremia; vectores AAV5 y AAV8 en hemofilia A y B respectivamente; y vectores AAV9 en la enfermedad de Pompe y en la atrofia muscular espinal (Büning et al. 2019). Los estudios en este ámbito continúan desarrollándose con una gran proyección y dinamismo, y actualmente son alrededor de 150 los ensayos clínicos registrados en los que están implicados distintos vectores AAV (<https://www.clinicaltrials.gov/>).

8. El parvovirus diminuto del ratón (MVM)

8.1. Características generales y cepas

El MVM se incluye dentro de la subfamilia *Parvovirinae*, género *Protoparvovirus* y especie *Protoparvovirus I* de ratón (Cotmore et al. 2014; Péntzes et al. 2020). Dentro de los MVM se distinguen dos cepas principales, la MVMp o cepa prototipo y la MVMI. La MVMp es un protoparvovirus aislado de un stock de adenovirus de ratón (Crawford 1966) que infecta fibroblastos murinos. La infección del MVMp es asintomática en ratones recién nacidos (Grekova et al. 2010; Kontou et al. 2005; Maxwell et al. 1995) y en ratones con inmunodeficiencia combinada severa (ratones SCID), aunque también puede evolucionar hacia variantes más virulentas tras adquirir modificaciones en su cápsida (Rubio et al. 2005; López-Bueno et al. 2006, 2008).

Otra cepa bien conocida y estudiada es la inmunosupresora o MVMI, que fue aislada a partir de una sublínea celular de linfoma EL-4 (Bonnard et al. 1976). La infección con MVMI es letal en ratones recién nacidos y en ratones SCID adultos, en los que induce un síndrome leucopénico severo y una eritropoyesis elevada (Segovia et al. 1999), consecuencias del tropismo del virus hacia precursores hematopoyéticos primitivos y de distintos linajes (Segovia et al. 1991, 2003). Además, también genera trastornos neurológicos en ratones recién nacidos por su marcado neurotropismo hacia neuroblastos del hipocampo y cerebelares (Ramírez et al. 1996), aunque también puede infectar múltiples órganos como riñones, corazón o pulmones (Brownstein et al. 1992).

A pesar de ser serológicamente idénticos, MVMp y MVMI presentan ligeras diferencias en su genoma debido al cambio en 163 bases, la mayoría de ellas silenciosas, que conllevan un total de 27 aminoácidos diferentes (Astell et al. 1986). Estas diferencias influyen en la capacidad de infectar distintos tipos celulares. Así, mientras que MVMI infecta líneas de linfocitos T, precursores hematopoyéticos primarios y neuroblastos, MVMp infecta fibroblastos de ratón y diversas líneas humanas transformadas. Cambios de unos pocos aminoácidos en las proteínas de la cápsida (ver más abajo) explican estas diferencias en el tropismo viral, aunque también participan como determinaciones otras regiones del genoma (Antonietti et al. 1988).

8.2. Organización genética

El MVM presenta un genoma de ADN monocatenario de 5 kb de longitud que codifica para proteínas estructurales de la cápsida (VP) y no estructurales (NS) (Cotmore et al. 2014, 2019). Las proteínas NS realizan funciones múltiples en el ciclo vital del virus y de interacción con la célula.

La proteína no-estructural principal es la NS1, una proteína larga de 83 kDa y que pertenece a la superfamilia de la helicasa 3 (SF3). Esta proteína está formada por distintos dominios con actividades helicasa, ATPasa, endonucleasa, de unión específica a ADN y distintas actividades esenciales para la replicación viral (Pénzes et al. 2020). Esta proteína se expresa a partir del promotor T4 y es el producto viral con mayor efecto citotóxico para las células (Grekova et al. 2010). Las tres isoformas de la proteína NS2 (28 kDa) varían con su extremo C-terminal (Jongeneel et al. 1986) y grado de modificación postraduccional (Santarén et al. 1993). Las proteínas NS2 son también multi-funcionales, y afectan a etapas tan diversas del ciclo vital de parvovirus como: (i) salida nuclear del virus (Bodendorf et al. 1999; Miller and Pintel 2002) mediada por la interacción con Crm1 (Engelsma et al. 2008), que también incrementa la eficacia biológica del virus y patogénesis en ratón SCID (López-Bueno et al. 2004); (ii) transducción de señales y regulación del ciclo celular (Lu et al. 1999); (iii) traducción de mensajeros virales (Naeger et al. 1993); (iv) ensamblaje de la cápsida (Cotmore et al. 1997); (v) replicación (Choi et al. 2005; Naeger et al. 1990); y (vi) multiplicación del virus en ratones recién nacidos (Brownstein et al. 1992).

Las proteínas estructurales (o VPs) que forman la partícula, son las VP1, VP2 y VP3. La proteína VP1, que contiene la secuencia completa de la proteína VP2 más una región N-terminal de 143 aa. Ambas proteínas proceden del RNA R3 que se transcribe desde el promotor P38, que sufre un corte y empalme (*splicing*) alternativo. La proteína VP3 se produce por una escisión del extremo N-terminal de la proteína VP2 cuando el virus se desplaza a través del endosoma durante la entrada. VP2 es suficiente para la formación de las cápsidas del MVM y para empaquetar el genoma ADNbs, pero las partículas no son infecciosas sin la presencia de la proteína VP1 (Tullis et al. 1993).

8.3. Ciclo vital del MVM

8.3.1. Adsorción y entrada

Para que la interacción virus-célula sea productiva y conduzca a la infección, el virus tiene que unirse con afinidad al receptor o receptores adecuados. Para esta etapa inicial de adsorción a la superficie celular, tanto el MVMp como el MVMi usan preferentemente glicanos, en los que el ácido síalico (sia) metilado en C-9 está unido por enlaces $\alpha 2-3$ o $\alpha 2-6$ con el siguiente azúcar (Figura 3). El uso de sia como receptor facilita la interacción virus-célula por su abundancia en superficie, de hecho se han estimado un rango de $4-8 \times 10^5$ moléculas de sia en líneas celulares establecidas (Linser et al. 1977; Spalholz et al. 1983) y primarias que son hospedadoras del MVM (Rubio et al, 2005). Es interesante que la diferencia en el reconocimiento de receptores de tipo sia da cuenta, al menos en parte, de la diferente patogenicidad (ver más abajo) y tropismo de ambas cepas. Así, el MVMi se puede unir a sia

Introducción

con enlaces α 2-8 de glicanos multisializados (glicoproteínas que permiten la infección de células neuronales), mientras que el MVMp se puede unir a derivados de sia como el 9-Oacetilado sobre-expresado en células de melanoma humano (Halder et al. 2014).

Sin embargo, múltiples líneas celulares tumorales, como las NB324K, presentan un tipo de N-glicano sializado que contiene el motivo sia-Lex (marcador de carbohidratos en células tumorales) reconocido tanto por el MVMp como por el MVMi, pero este reconocimiento no explica el diferente tropismo de ambas cepas entre las distintas líneas celulares (Halder et al. 2014). Esto sugiere que el reconocimiento de distintos tipos de receptores sia no es el único determinante del tropismo, y otros factores intracelulares deben estar implicados.

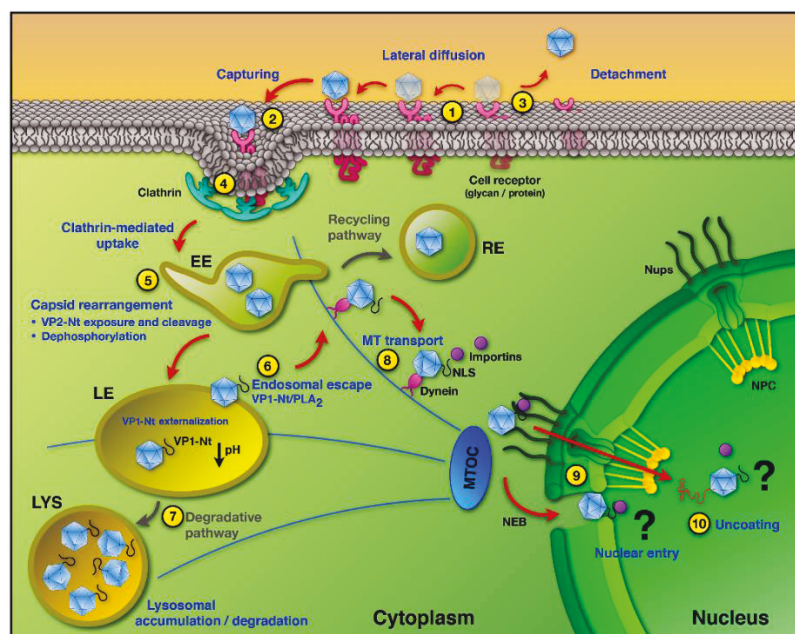


Figura 3. Mecanismos implicados en la entrada del MVMp. En la infección productiva, las cápsidas del MVM se unen a receptores de tipo ácido (sia). (2) Tras una difusión lateral, las cápsidas son capturadas en vesículas de clatrina (3) o, se desprenden de sus receptores. (4) Las cápsidas son internalizadas por endocitosis mediada por clatrina (5) donde el bajo pH y enzimas diversas desencadenan reordenamientos estructurales, incluyendo la exposición y escisión *de novo* de VP2-Nt y la desfosforilación de partículas que llevan a la exposición de VP1-Nt a través del poro en el eje 5X. El tráfico endosomal puede variar en complejidad y en tiempo, pero solo una pequeña porción de partículas escapa por la actividad de la fosfolipasa A2 de VP1 a través de la membrana endosomal. (7) Las partículas que no logran escapar se acumulan en los lisosomas donde se degradan. (8) En el citosol, MVM se ayuda del citoesqueleto y de las proteínas motoras para moverse hacia el núcleo celular. (9) No está claro como entran los virus al núcleo, se han propuesto mecanismos que implican a los poros nucleares (NPC), o que requieren una permeabilización de la envoltura nuclear. (10) La desencapsidación del genoma tendría lugar durante la interacción con las proteínas del NPC y/o después de la entrada al núcleo de la cápsida. Reproducido de: (Ros et al. 2017).

En un proceso complejo que sigue a la adsorción, el MVM inicia la entrada a la célula propiamente dicha, que sucede por endocitosis mediada por receptor. A lo largo de este proceso el virión que es rígido

y robusto en el exterior celular, debe sufrir cambios estructurales definidos y superar numerosas barreras para transitar con éxito desde la superficie celular al núcleo para la entrega del genoma. En la Figura 3 se han ilustrado las etapas principales de este proceso que se comentan brevemente en su leyenda.

8.3.2. Replicación y ensamblaje

Cuando el virus ha accedido a la entrega del genoma de ADNbs en el núcleo, este es convertido a ADNdb por polimerasas de la célula y comienza su expresión génica. Esta dependencia de polimerasas celulares cuyas funciones y actividades se inducen preferentemente en la fase S, explica la dependencia del MVM y de los parvovirus en general por el ciclo celular: el MVM necesita de la maquinaria de replicación inducida en la transición G1/S para comenzar la transcripción de su genoma, si bien la replicación del genoma del virus sucede en la fase S tardía y G2 (Gil-Ranedo et al. 2015).

Un modelo básico del ciclo vital del virus relacionado con las proteínas VPs, en las que se centra el estudio que aquí se presenta, se ilustra en la Figura 4.

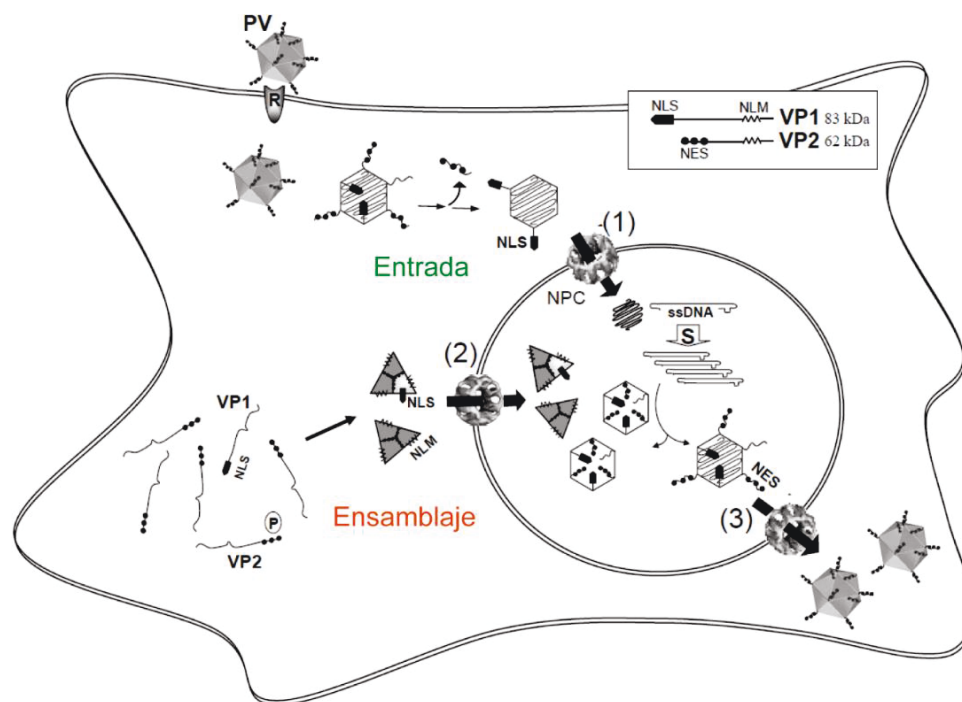


Figura 4. Ciclo vital del MVMp. Se ilustran las etapas esenciales mejor conocidas. (1) Transporte de las partículas virales al núcleo. Tras la unión al receptor e internalización, se elimina la secuencia de exportación nuclear (NES) situada en el extremo N-terminal de la VP2 lo que permite la exposición de la secuencia de localización nuclear de VP1 (NLS) necesaria para la entrega del genoma viral a través del complejo del poro nuclear (NPC). (2) Ensamblaje. Las proteínas estructurales VP1 y VP2 son fosforiladas en el citoplasma y translocadas como trímeros al núcleo por la actividad del motivo NLM. (3) Maduración. El ADN viral se amplifica en la fase S/G2 del ciclo celular y se encapsula para formar los viriones, que salen del núcleo antes de la lisis celular de forma activa por fosforilaciones y por la NES. Modificado de: (Valle et al. 2005).

El genoma viral se replica en el núcleo de las células, pero las proteínas estructurales de la cápsida son sintetizadas en el citoplasma y son translocadas al núcleo para su posterior ensamblaje en forma de trímeros (Riolobos et al. 2010) y por medio de un transporte activo a través de NLS (secuencia de localización nuclear) de VP1 y/o NLM (motivo de localización nuclear) de VP2 (Lombardo et al. 2000). Tanto la fosforilación de VP1 como de VP2 juegan un papel importante en el plegamiento de las proteínas, en el tráfico de los viriones desde el núcleo hasta el citoplasma celular, en la encapsidación del genoma y en la maduración del virus (Gil-Ranedo et al. 2018). La fosforilación de las VPs y por tanto su competencia en translocación nuclear, está acoplada al ciclo celular (Gil-Ranedo et al. 2015). Una vez ensamblados, los viriones salen del núcleo gracias a la fosforilación y exposición del extremo N-terminal de VP2, aunque en algunos tipos celulares se requiere de canales alternativos de salida. La salida del núcleo tiene lugar previo a la rotura de la membrana nuclear y, por tanto, de forma previa a la presencia de efectos citotóxicos masivos en las células huésped.

8.4. Estructura y dominios en la cápsida del MVM

El MVM presenta una cápsida icosaédrica de 25 nm de diámetro, sin envuelta y con una disposición de sus subunidades en simetría T1. La cápsida está compuesta por 60 copias de las proteínas estructurales VP1 (83 kDa), VP2 (64 kDa) y VP3 (61 kDa) de las cuales la VP1 constituye aproximadamente el 15-20 % de la masa total de la cápsida (Kontou et al. 2005; Maxwell et al. 1995). Se dispone de la estructura cristalina de alta resolución obtenida por difracción de rayos X para la cápsida de las dos cepas mejor conocidas de este virus, la MVMi (Agbandje-McKenna et al. 1998; Llamas-Saiz et al. 1997), y la MVMp (Kontou et al. 2005). En la estructura de la cápsida del MVM se observan los ejes de simetría que se caracterizan por su diferente estructura y topología de superficie (Figura 5), y que desempeñan distintas funciones de la cápsida como se describe a continuación.

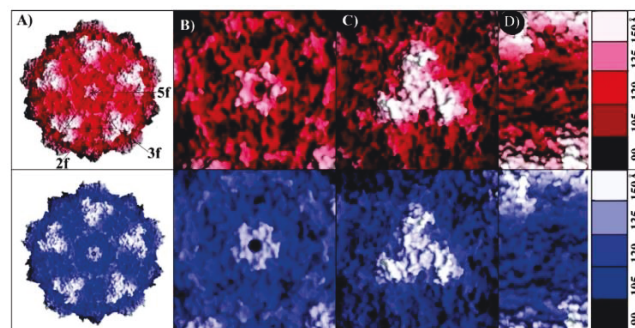


Figura 5. Cápsida del MVM con detalle de los dominios poro (5X), espícula (3X) y hoyuelo (2X). (A) Cápsidas de los parvovirus MVMp (en rojo) y MVMi (en azul). Se marca la localización de los distintos dominios dentro de uno de los trímeros (triángulo) de la cápsida del MVMp. Los paneles (B, C y D) muestran el detalle de cada uno de los dominios de las cápsidas: el poro (5X), la espícula (3X) y el hoyuelo (2X) respectivamente. En la parte derecha del panel se muestra la gama de colores que indican la profundidad desde el centro de las partículas virales. Reproducido de: (Kontou et al. 2005).

Son tres los dominios de la cápsida del MVM que se han manipulado en este estudio (en la Figura 6 se muestran las estructuras de dos de estos dominios) y que son por tanto de especial interés describirlos:

1. En el eje de simetría de orden 3 (3X) se observa una protusión denominada a veces espícula. Como se describe al comienzo de Resultados, la espícula es muy inmunogénica, de hecho se han caracterizado en detalle los residuos que interaccionan con algunos anticuerpos neutralizantes (Kaufmann et al. 2007).

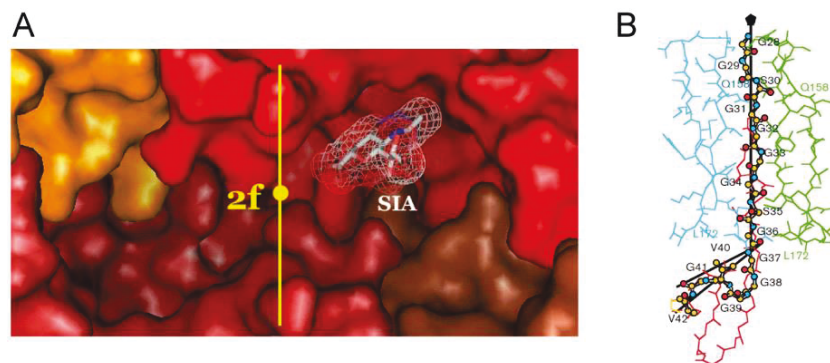


Figura 6. Estructura del hoyuelo y del poro de la cápsida del MVMp. (A) Detalle del eje 2X (hoyuelo); zona de unión a receptores de ácido siálico (sia). Reproducido de (López-Bueno et al. 2006). (B) Detalle de la estructura y de los aminoácidos que componen el poro del MVMp. Reproducido de: (Agbandje-McKenna et al. 1998).

2. En el eje de simetría de orden 2 (2X) se localiza una depresión u hoyuelo implicada en el reconocimiento y unión al receptor principal del MVM, el ácido siálico (López-Bueno et al. 2006). El reconocimiento de sia en el hoyuelo juega un papel importante en la virulencia de MVM *in vivo*. En ratones adultos con inmunodeficiencia severa combinada (SCID), la cepa MVMp evoluciona hacia variantes genéticas letales que portan cambios de un solo aminoácido (V325M, I362S, o K368R) en residuos del hoyuelo que establecen contacto directo con el receptor sia (Rubio et al. 2005; López-Bueno et al. 2006). Los datos sugieren que estos cambios de amino ácidos que determinan la virulencia alteran la afinidad de unión de la cápsida del MVM a ciertos tipos de sia comunes, en lugar de una especificidad por distintos tipos de sia.

Cuando la infección de ratones scid por MVMp se extiende en el tiempo, se induce un cambio dramático en su patogenicidad que implica la aparición de una población viral heterogénea hematotrópica, que alberga múltiples cambios genéticos confinados en el hoyuelo rodeando el sitio de unión del receptor sia (López-Bueno et al. 2008). Sin embargo, no está claro cómo la unión de la cápsida a los sia-glicanos puede determinar el tropismo del MVM *in vitro* y en ratones. En ensayos de unión realizados *in vitro*, la composición de N- y O-glicanos y glicolípidos polares en distintas líneas celulares no logró explicar el tropismo de las cepas del MVM basándose únicamente en la composición de los

tipos de sía de la superficie celular (Halder et al. 2014; Nam et al. 2006), lo que indica la contribución de otros factores aún desconocidos.

3. En el eje de simetría de orden 5 (5X) se localiza un poro que tiene una gran importancia en la exposición de los extremos desordenados de las proteínas VP1 y VP2, lo que es necesario para el tráfico intracelular de los viriones (Sánchez-Martínez et al. 2012). Para la entrada, el dominio N-terminal de la proteína VP2 (2Nt) juega un papel fundamental. La escisión de la mayoría de estos dominios, que se exponen de forma dinámica en la superficie de la cápsida, permite la entrada. Se ha sugerido que una vez el virus ha alcanzado el endosoma, la repulsión de carga y la presión del genoma viral dentro de las cápsidas junto con el bajo pH endosomal, da lugar a la exposición de los restantes dominios 2Nt que aún permanecían dentro de la cápsida del MVM (Sánchez-Martínez et al. 2012). Esta exposición se facilita por una serie de residuos de glicina del 2Nt (Castellanos et al. 2013) y un reordenamiento de residuos de la cápsida situados en el poro (eje 5X) (Reguera et al. 2004). Estos cambios estructurales junto con la escisión dinámica de los dominios 2Nt que se van exponiendo, permite la externalización de los dominios VP1-Nt fuera de la cápsida (Farr et al. 2006; Sánchez-Martínez et al. 2012), y con ello la activación de la fosfolipasa que porta, lo que permite la salida de los viriones del endosoma (Zádori et al. 2001).

8.5. El MVM como virus oncolítico.

Una de las características que hacen del protoparvovirus MVM un virus muy interesante para la investigación biomédica es su potencial oncolítico. Las dos cepas más estudiadas de este virus, MVMp y MVMi, poseen propiedades oncolíticas de interés, por tratarse de un virus pequeño de elevada capacidad de difusión intra-tumoral y no patogénico para humanos. La capacidad oncolítica del MVM se ha demostrado contra distintas células tumorales humanas (Rubio et al. 2001; Riolobos et al. 2010; Paglino et al. 2012), y en modelos preclínicos de roedores implantados con tumores de ratón (Guetta et al. 1986) así como con células madre de glioblastoma humano en implantes ortopédicos (Gil-Ranedo et al. 2021).

Entre los mecanismos moleculares que explican esta capacidad oncolítica selectiva, se han de destacar los siguientes: (i) dependencia por la fase S de su ciclo celular (Cotmore et al. 1987), que como se ha mencionado antes es requerida para la conversión del genoma entrante ADNbs a genoma ADNdb que pueda ser transcrito por las polimerasas de la célula (Bashir et al. 2000); (ii) expresión de la proteína citotóxica NS1 durante la transición G1/S que detiene el ciclo celular (Gil-Ranedo et al. 2021); (iii) translocación de las VP al núcleo celular en la fase S (Gil-Ranedo et al. 2015) que va ligada a su fosforilación por la quinasa Raf-1 de las MAPKs (Riolobos et al. 2010); (iv) replicación del genoma en fase S/G2 (Gallego-García et al., en preparación); (v) requerimiento de estados de diferenciación celular

que permiten la infección lítica y productiva en tejidos neoplásicos proliferativos (Antonietti et al. 1988; Grekova et al. 2010); (vi) replicación en células con mecanismos de defensa antiviral ineficientes (Ventoso et al. 2010), como los que se encuentran con frecuencia en los tumores, deficientes en la respuesta basada en IFN-I (interferón de tipo I), lo que facilita la infección selectiva de ciertas células tumorales humanas (Grekova et al. 2010).

8.6. Manipulación de la cápsida del MVM con VEbp.

En base al potencial oncolítico del MVM, se investigó en un estudio previo de este laboratorio la posibilidad de potenciarlo dirigiendo el virus hacia la vasculatura tumoral. Esta investigación se abordó a través de dos estrategias que partían de la manipulación de la cápsida del MVM con péptidos VEbp: una perseguía inducir anticuerpos anti-VEGF, otra dirigir el tropismo del virus hacia células que expresen VEGFR-1. Para estos objetivos, las Dras. Grueso y Sánchez-Martínez construyeron múltiples quimeras del MVM con péptidos VEbp que sustituían residuos wt en los tres dominios de la cápsida (poro, hoyuelo y espícula) antes mencionados (Grueso, 2006).

Estas quimeras construidas en clones genómicos, portadoras de una o dos sustituciones, fueron probadas en su capacidad para replicar el genoma del virus y generar partículas virales vacías y llenas de ADN. En algunos casos se realizaron también ensayos preliminares para estudiar su tropismo, aunque los resultados obtenidos no fueron concluyentes. La extensa colección de genomas quiméricos construidos, y las dificultades y exigencias experimentales para caracterizar con rigor cada uno de los fenotipos, determinaron que aquellos objetivos no pudieran realizarse a término.

Por ello, en el presente estudio se decidió reexaminar la colección completa de estas quimeras del MVM, para identificar aquellas que puedan tener realmente potencial oncolítico relevante, tales como capacidad de producir viriones que progresen en cultivo de células transformadas, inducción de anticuerpos anti-VEGF, o infección selectiva de células que expresen VEGFR-1.

OBJETIVOS

Muchos de los tratamientos más estudiados y utilizados contra la progresión tumoral se basan en el uso de moléculas anti-angiogénicas. Como ya se ha mencionado anteriormente, el VEGF es uno de los factores principales en el desarrollo de la angiogénesis y, por tanto, una de las principales dianas en las terapias actuales anti-cáncer (Lavie et al. 2013; Rhim et al. 2007; Tomita et al. 2019). Algunas de estas terapias de mayor importancia clínica inhiben la vía del VEGF con anticuerpos monoclonales, como es el caso del Bevacizumab. Sin embargo, este tipo de inmuno-terapias pasivas presentan limitaciones e inconvenientes, como la necesidad de una administración sistemática a lo largo de tiempos prolongados, lo que conlleva la aparición de resistencias en tumores metastásicos (Lavie et al. 2013; MacLachlan et al. 2011).

Otras aproximaciones alternativas para contrarrestar las funciones del VEGF utilizan vectores virales. En esta área, el parvovirus MVM ofrece características de interés por su capacidad oncolítica demostrada *in vitro* y en modelos preclínicos. Es por ello que en nuestro laboratorio se habían construido previamente, mediante diseño racional, quimeras del MVMp portadoras de distintos péptidos de unión a receptores de VEGF (VEbp) en dominios de la cápsida.

En el trabajo que se presenta se han estudiado en detalle las propiedades bioquímicas de estos virus quiméricos, tanto la tolerancia de la cápsida del MVMp a los VEbp, como la inmunogenicidad de las quimeras, o la capacidad de estos péptidos para dirigir el virus a unir VEGFR-1.

Con esta finalidad, los objetivos concretos planteados en este trabajo fueron los siguientes:

1. Estudiar la tolerancia funcional de la cápsida del MVMp a dos VEbp que sustituyen residuos de la espícula (eje de simetría 3X).
2. Determinar la exposición de los VEbp en la superficie del eje 3X de estas cápsidas quiméricas, la preservación de su configuración estructural, así como su capacidad inmunogénica.
3. Estudiar la tolerancia funcional de la cápsida del MVMp a VEbp que sustituyen simultáneamente residuos de la espícula y del hoyuelo (eje de simetría 2X).
4. Analizar la implicación de VEGFR-1 y del ácido siálico en la unión e infección de las quimeras MVM-VEbp en líneas celulares humanas de fibroblastos transformados y de glioblastoma.

MATERIALES Y MÉTODOS

1. Células Eucariotas

1.1. Líneas celulares, mantenimiento y cultivo.

Para el desarrollo del presente trabajo se han utilizado las siguientes líneas celulares:

- NB324K. Fibroblastos de riñón de recién nacido humano transformados con el virus de simio 40 (SV40) (Shein et al.1962).
- U373 MG. Células de glioblastoma astrocitoma humano derivado de tumor maligno (ATCC: HTB17).
- A9. Línea celular derivada de fibroblastos L de ratón y que presentan un fenotipo hipoxantina-guanina-fosforribosil-transferasa negativo (HGPRT-).

Estas líneas se cultivaron y se mantuvieron en medio Eagle modificado por Dulbecco (DMEM), tamponado con NaHCO_3 en una concentración del 0,3 % y suplementado con 2 mM de L-Glutamina, 0,4 mM de aminoácidos no esenciales (L-Ala, L-Asn, L-Asp, L-Glu y L-Pro), una mezcla de antibióticos (75 U/mL de estreptomycin y 75 $\mu\text{g/mL}$ de penicilina G), y suero fetal bovino (FBS) descomplementado durante 30 min a 56 °C (Gibco BRL). Los porcentajes de FBS utilizados varían dependiendo del tipo celular, se utilizó 5 % para el cultivo y mantenimiento de las células NB324K y A9 y 10 % para las células U373 MG.

Para el subcultivo celular, las monocapas se sometieron a un tratamiento con tripsina. Una vez la tripsina ha provocado un redondeamiento celular observable al microscopio, esta se detuvo con medio DMEM que contiene 5 - 10 % de FBS que inhibe su actividad. A continuación, se levantaron las células con pipeta y se contaron con la ayuda de una cámara de Neubauer (Brand). Por último, las células fueron sembradas a la densidad adecuada para cada tipo de experimento. Los cultivos celulares fueron mantenidos en un incubador a 37 °C, 5 % de CO_2 y 95 % de humedad.

1.2. Transfección de células NB324K

Para las transfecciones se siguió el protocolo detallado en (Lombardo et al. 2002) el cual se explica brevemente a continuación. En primer lugar, $3 \cdot 10^6$ células NB324K fueron electroporadas con 10 μg de plásmido enriquecido por medio de cromatografía (Qiagen) y con 25 μg de ADN *Carrier* (esperma de salmón). En el caso de las electroporaciones realizadas para el crecimiento de los virus quiméricos se requirieron transfecciones a gran escala. La electroporación se desarrolló en cubetas de 0,4 cm de diámetro aplicando, con la ayuda de un Gene Pulser con un extensor de capacitancia (Bio-Rad), un pulso

a 230 V y 250 μ F. Por último, se diluyeron las células en medio DMEM con un 5 % de FBS y se sembraron a la densidad deseada en cada caso.

2. Células Procariotas

2.1. Cepas, mantenimiento y cultivo

Se han utilizado las siguientes cepas de *Escherichia coli* (*E. coli*):

- DH5 α . Cepa bacteriana deficiente en recombinación utilizada para el cultivo y crecimiento de plásmidos diversos.
- JC8111. Cepa utilizada para amplificar los plásmidos que contienen la secuencia completa del genoma de MVMp (Merchlinsky et al. 1983) manteniendo su capacidad para generar viriones infecciosos.

Ambas cepas bacterianas fueron cultivadas en placas Petri con medio LB suplementado con un 1,5 % de agar y 100 μ g/mL de ampicilina. Su conservación se realizó en medio LB suplementado con un 15 % de glicerol y a una temperatura de -70 °C.

2.2. Transformación de las células procariotas y purificación de plásmidos.

La transformación de la cepa DH5 α se realizó por medio de choque térmico mezclando 50 μ l de bacterias competentes con 1 μ l del plásmido de interés a una temperatura de 4 °C. Se incubaron durante 30 min a 4 °C y, a continuación, se mantuvieron durante 40 segundos a 42 °C. Pasado este tiempo, se incubaron 2 min a 4 °C, se diluyeron en medio LB y se incubaron durante 1 hora a una temperatura de 37 °C. Finalmente, se sembraron en el medio de cultivo correspondiente.

La transformación de la cepa JC8111 se realizó por medio de electroporación mezclando 40 μ l de bacterias competentes con 1 μ l del plásmido de interés en cubetas de 0,2 cm (Equibio). La electroporación se realizó en un electroporador Gene Pulser (Bio-Rad) y en condiciones de 2500 V, 25 μ F y 200 Ω . A continuación, se diluyeron en medio LB y se incubaron durante 1 hora a 37 °C. Finalmente, al igual que con DH5 α , se sembraron las bacterias en el medio de cultivo correspondiente.

Los plásmidos obtenidos fueron purificados a gran escala con kits Kits Plasmid Maxi (Qiagen) utilizando el protocolo del fabricante.

3. Construcción de las quimeras MVM-VEbp.

Las quimeras del MVM, con sustitución de residuos wt por VEbp en la espícula (3X), hoyuelo (2X) y poro (5X) de la cápsida fueron construidas por las Dras. Grueso y Sánchez-Martínez (ver Grueso, 2006). Por su relevancia para el trabajo que se presenta, el procedimiento seguido se describe brevemente a continuación. Las construcciones se realizaron por mutagénesis dirigida utilizando el plásmido pSVtk-VPs (Ramírez et al. 1995) que expresa las proteínas VP1 y VP2 del MVMp bajo el control del activador de SV40 junto con el promotor de la timidina quinasa. Para ello, se utilizaron las polimerasas Platinum Pfx (Invitrogen) y Pwo (Roche) de alta fidelidad con los programas de PCR del fabricante, y los fragmentos amplificados se clonaron mediante las enzimas de restricción EcoRI y XbaI. A continuación, se clonó en el plásmido infeccioso pMM984 (Merchinsky et al. 1983) entre los sitios de restricción HpaI y XbaI (nucleótidos 3759 a 4342). Los plásmidos genómicos obtenidos a partir de una colonia transformada de *E. coli* JC8111 fueron también secuenciados.

En el caso de las quimeras con modificaciones en la espícula (MVM-P6L, MVM-A7R y NdPs) se reemplazaron los aminoácidos P434-N439 del wt situados entre los nucleótidos 4089-4111 por la secuencia P6L (PQPRPL), A7R (ATWLPPR), o N6G (NIRRQG) entre los aminoácidos N433-K438. En el caso de las quimeras obtenidas por modificaciones en el hoyuelo la inserción de los tres péptidos VEbp mencionados se realizó entre los aminoácidos I362-K368 de VP2. Los oligonucleótidos utilizados para estas construcciones y las dianas de restricción generadas para facilitar los clonajes se detallan en Grueso, 2006.

4. Protoparvovirus Diminuto del Ratón.

4.1. Producción y purificación de viriones y cápsidas vacías.

En este estudio se utilizó la cepa prototipo (p) del protoparvovirus *Minute Virus of Mice* (MVMp; Crawford 1966). Para su producción, así como de las quimeras construidas, se partió de los plásmidos infecciosos respectivos. Las células NB324K transfectadas se recogieron tras 48 hpt (horas post-transfección), se sometieron a ciclos de congelación / descongelación y se clarificaron por centrifugación a baja velocidad. Tras la centrifugación los virus obtenidos en el sobrenadante se titularon por medio de un ensayo de formación de placas de lisis (PFU) (ver apartado 4.3) y se guardaron a -70 °C en alícuotas como stock de pase 0.

Para generar stocks de virus a gran escala, se infectaron células NB324K en confluencia y sembradas en placas de cultivo P100 con los virus obtenidos en el paso anterior a una multiplicidad de infección

(MOI) de 10^{-3} PFU / célula. Tras 20 hpi (horas post-infección) se realizó un subcultivo de las células infectadas a una dilución 1/8 y se mantuvieron durante una semana, tras la cual se pudo observar un efecto citopático en, al menos, el 50 % de las células. Las células se rasparon en su propio medio de cultivo y se centrifugaron durante 5 min a 5000 rpm y a 4 °C. Por un lado, el sobrenadante se incubó durante 24 horas a 4 °C en una solución que contenía el 3,4 % de Polietilenglicol (PEG) y 0,5 M de NaCl. A continuación, se centrifugó durante 30 min a 5000 rpm, se resuspendió el sedimento en PBS - 0,1 % de Sarkosil y se sometió a una sonicación de 20 Hz durante aproximadamente 5 min con el objetivo de romper posibles agregados virales. Por otro lado, el sedimento celular se sometió a ciclos de congelación / descongelación, se resuspendió en PBS - 0,1 % de Sarkosil y se sometió también a una sonicación de 20 Hz durante, al menos, 5 min. A partir de aquí, ambas muestras se reunieron y los agregados junto con los demás restos celulares se eliminaron por medio de centrifugación durante 20 min a 4 °C y 8000 rpm.

Para purificar las partículas virales se procedió primero a concentrarlas por ultra-centrifugación a 16000 rpm durante 18 h y a 15 °C a través de un colchón de sacarosa al 20 % con 0,1 % de Sarkosil (Gil-Ranedo et al. 2018; Maroto et al. 2000; Sánchez-Martínez et al. 2012). El sedimento se resuspendió en 1 mL de PBS con 0,1 % de Sarkosil en frío y agitación suave. Posteriormente, este volumen se completó hasta un total de 10 mL en una solución de cloruro de cesio (CICs) a una densidad de 1,38 g/mL, ajustado por refractometría, y se sometieron a ultra-centrifugación durante 24 h a 8 °C y a 50000 rpm. Las fracciones obtenidas se separaron en alícuotas de 0,5 mL y se sometieron a un ensayo de hemaglutinación (ver apartado 4.2) con el objetivo de seleccionar y reunir aquellas alícuotas correspondientes a los viriones llenos de ADN (densidad de 1,39 – 1,41 g/mL) y a las cápsidas vacías (densidad de 1,32 g/mL) respectivamente. Ambas partículas virales fueron dializadas contra una solución salina tamponada con fosfato (PBS) durante 24 h a 4 °C y se mantuvieron en alícuotas a 70 °C. En algunos casos, los virus quiméricos llenos de ADN que rendían pocas partículas se concentraron por centrifugación a 4 °C en filtros Amicon Ultra-15 (Millipore) tal y como recomienda el fabricante. Los títulos de los virus infecciosos se determinaron mediante un ensayo PFU estándar (Gil-Ranedo et al. 2018) o determinando cuantitativamente el número de células que expresan VP (definido como unidades de inmunofluorescencia; UIF) inoculando monocapas de células NB324K cultivadas sobre cubreobjetos con diluciones seriadas en triplicado (Lombardo et al. 2002; Sánchez-Martínez et al. 2012).

4.2. Ensayo de hemaglutinación.

El MVM, al igual que la mayoría de los parvovirus, posee la capacidad de aglutinar eritrocitos (Siegl 1984) que permite estimar la concentración de partículas virales, tanto viriones llenos de ADN como cápsidas vacías (Hernando et al. 2000).

Para ello, se utilizó sangre de ratón adulto previamente tratada con el anticoagulante heparina. La sangre se diluyó en PBS previamente enfriado a 4 °C y se lavó varias veces por centrifugación a 1500 rpm durante 5 min. El sedimento de eritrocitos se resuspendió al 50 % en PBS y se mantuvo a 4 °C hasta su uso. El ensayo de hemaglutinación se realizó en placas de 96 pocillos con fondo en forma de “U” realizando diluciones seriadas de ½ de las muestras a testar en un volumen final de 100 µl. A continuación, se añadieron a cada pocillo 50 µl de eritrocitos diluidos en PBS al 2 %, se agitaron suavemente las placas y se mantuvieron en oscuridad durante al menos 2 h a 4 °C. Finalmente, se estimaron las unidades de hemaglutinación (UHA) recuperadas a partir de la inversa de la última dilución con actividad hemaglutinante.

4.3. Valoración de infectividad por formación de placas de lisis (PFU).

Para determinar los títulos de los viriones se realizó un ensayo de formación de placas de lisis o PFU. También se empleó este método para estimar los tamaños de placas de lisis producidas por cada virus quimérico. Se siguió básicamente un protocolo previamente descrito (Gil-Ranedo et al. 2018; Tattersall and Bratton 1983). Para ello, se sembraron $2 \cdot 10^5$ células NB324K en placas P60, que al día siguiente se inocularon con 500 µl de distintas diluciones de virus diluidas en PBS⁺⁺. Se realizó la absorción de los virus durante 1 hora a 37 °C en agitación, tras lo cual se retiró el inóculo y se añadieron 5 mL de medio DMEM suplementado con 0.2 M de L-Glutamina, una mezcla de antibióticos que contiene Estreptomicina y Penicilina G, aminoácidos no esenciales (L-Ala, L-Asm, L-Asp, L-Glu y L-Pro), 10 % FBS y agarosa de bajo punto de fusión (LM-GCT) al 0,7 %. Una vez se gelificó la agarosa tras mantenerlas durante 5 min a 4 °C, las placas se incubaron las placas durante 6 días en el incubador a 37 °C, con atmósfera del 5 % de CO₂ y 95 % de humedad. Pasado este tiempo, las monocapas se fijaron durante al menos 1 hora con formaldehído al 10 %. A continuación, se retiró la agarosa y se tiñeron las monocapas durante una hora con cristal violeta al 0,1 % diluido en formaldehído al 4 %. Finalmente, se dejaron secar las placas y procedió al recuento de las placas de lisis presentes en cada una de ellas.

Además, se utilizó otro método que permite tanto la titulación de los virus como una mejor observación del tamaño de placa. En este caso, las monocapas fueron fijadas durante 5 min y a -20 °C con una solución de metanol y acetona a volúmenes iguales. A continuación, se dejaron secar las monocapas a temperatura ambiente, se lavaron dos veces con PBS y se bloquearon durante 30 min también a temperatura ambiente con PBS y 2 % de suero fetal bovino (FBS). Las monocapas, se incubaron seguidamente, durante una hora y media a temperatura ambiente, con el anticuerpo α -VP2 de conejo diluido en PBS - 2 % FBS. De nuevo, se lavaron las monocapas con PBS y se incubaron durante 1 hora con un anticuerpo Ig anti-conejo conjugado con peroxidasa diluido en PBS - 2 % FBS. Por último,

las monocapas se lavaron con PBS y se revelaron a distintos tiempos controlando los fondos con DAB (3,3'-diaminobenzidina tetrahidrocloruro) a una dilución 1/100 en presencia de H₂O₂.

4.4. Análisis de ensamblaje de cápsidas.

Para caracterizar los patrones de ensamblaje de las cápsidas del MVM, los plásmidos genómicos (wt o quiméricos), así como los plásmidos que expresan solo VP (derivados de pSVtk-VP), se transfectaron en células NB324K y los extractos de proteínas se sometieron a un análisis de sedimentación (Riolobos et al. 2006). Brevemente, las células transfectadas lavadas con PBS se rasparon en tampón HNEM (HEPES 50 mM, pH 8,0, NaCl 150 mM, MgCl₂ 2 mM, EDTA 1 Mm) suplementado con inhibidores de proteasas (fluoruro de fenilmetilsulfonilo 0,1 mM [PMSF], leupeptina 10 µg/ml, pepstatina 10 µg/ml, aprotinina 10 µg/ml, TPCK [tosilsulfonilfenilalanil clorometilcetona] 100 µg/ml, e inhibidores de fosfatasa (glicerol fosfato 20 mM, NaF 5 mM), y se disgregaron en un baño sonicador sobre agua fría. Los lisados celulares se clarificaron mediante centrifugación a 15.000 g y 4 °C durante 30 min, se dispusieron sobre 14 ml de un gradiente continuo de sacarosa del 5 % al 30 % preparado en HNEM, y se ultra-centrifugaron a 160.000 g en un rotor SW40 (Beckman) a 5 °C durante 6 h para el análisis de formación de cápsidas, o 1 h para los ensamblados y agregados supravirales. Los marcadores de masa molecular fueron tiroglobulina (669 kDa; 19S; Sigma) y partículas virales purificadas: cápsida vacía de MVMp (70S), virión lleno de ADN de MVMp (110S) y los bacteriófagos Φ29 (254S) y λ (390S). Las fracciones se ensayaron para infectividad (UIF) y se determinaron las cantidades de proteínas VPs en cada una de ellas mediante slot-blot (Hoefer) revelados con el anticuerpo policlonal anti-VP. Para la cuantificación de las señales de VPs, las películas se escanearon con un densitómetro (Bio-Rad GS-900) y las intensidades de banda relativas se determinaron con Image Lab v.5.2 (Bio-Rad).

4.5. Análisis genético de la evolución de MVM en cultivo.

Para estudiar la evolución de virus quiméricos en cultivo, se preparó ADN de bajo peso molecular (Ramírez et al. 1995) de cultivos de células infectadas con el virus quimérico MVM-A7R. Este ADN se usó como molde para obtener clones moleculares mediante amplificación por PCR con los cebadores vVP-3 (5' = -CGCACTAGACCACCTGC-3') y VPSeq-1 (5' = -GTTTCCAGTAGCAGTTGG-3'). El producto se digirió con la enzima de restricción NspI, y el fragmento de VP2 que abarca los cuatro bucles de la espícula se aisló del gel y se clonó en pUC19 en el sitio SphI transformando la cepa *E. coli* DH5α. Los plásmidos respectivos recombinantes se purificaron a partir de clones bacterianos (Wizard Plus SV minipreparaciones; Promega). En paralelo, se aislaron clones infecciosos MVM, MVM-P6L y

MVM-A7R de placas de lisis (PFU) formadas en monocapas de células NB324K teñidas con rojo fenilo. Cada clon viral se incubó en 100 µl de Tris (50 mM, pH 7,5) a 4 °C durante la noche, se clarificó por centrifugación y se almacenó a 20 °C. Las muestras se amplificaron con *GoTaq Green Master Mix* (Promega) utilizando los cebadores vVP4 (2945 a 2961; 5' = -CGCATTATAGATTCTTG-3'), vVP-3 (2704 a 2720; 5' = -CGCACTAGACCACCTGC-3') y VPSeq-2 (5' = -CCATTTAGTGGTGGTGG-3') para amplificar las regiones que contienen los bucles 1, 2 y 3, y los cebadores vVP-8 (5' = -GCCAATGGCAGTGTTAG-3') y VPSeq-1 (4489 a 4506; 5' = -GTTTCCAGTAGCAGTTGG-3') para la región del bucle 4. Los fragmentos de ADN amplificados se aislaron y purificaron (Wizard SV Gel y PCR Clean-Up System; Promega) de geles de agarosa y se secuenciaron mediante secuenciación automática. Las mutaciones se confirmaron mediante dos rondas de análisis de secuencia con el software DNASTar Lasergene v7.1.0 y el editor de alineación de secuencias BioEdit v7.0.9.0.

5. Anticuerpos.

5.1. Inmunización de ratones.

Se inyectaron ratones BALB / c de 8 semanas de edad en la vena de la cola con MVMp y cápsidas purificadas quiméricas (Ps o As), o con los viriones respectivos llenos de ADN. Se administró en una sola inyección 1 µg de partícula viral purificada por ratón en 100 µl de PBS sin adyuvante. La sangre se recogió un mes después de la inyección, se coaguló a 37 °C durante 20 min, y se centrifugó a 2.000 g durante 10 min a 4 °C. El suero recuperado se inactivó por calor a 55 °C durante 15 min y se almacenó en alícuotas a -70 °C.

5.2. Tipos de anticuerpos.

Los anticuerpos anti-MVM utilizados en este trabajo han sido descritos previamente y son los siguientes:

- Anti-VP (α -VP). Antisero policlonal de conejo que se generó contra la proteína VP2 desnaturalizada y se utilizó para la localización general de las proteínas VP1 y VP2 independientemente de su configuración (Gil-Ranedo et al. 2015).
- Anti-VP2 (α -VP2). Anticuerpo policlonal de conejo generado también contra proteína VP2 desnaturalizada.
- Anti-B7 (α -B7). Anticuerpo monoclonal de ratón que reconoce la configuración del epítipo localizado en el eje de orden tres (3X o espícula) (Kaufmann et al. 2007; López-Bueno et al.

2003) de la cápsida vacía intacta y del virus completo, lleno de ADN, pero que no reacciona con subunidades de VP aisladas ni con trímeros (Riolobos et al. 2006, 2010).

- Anti-MVM (α -MVM). Anticuerpo producido en conejo contra la cápsida del MVM nativa, se utiliza principalmente para reconocer epítomos conformacionales (Lombardo et al. 2000; Santarén et al. 1993).
- Anti-NS1 (α -NS1). Anticuerpo producido en conejo contra la proteína no estructural NS1 del MVM (Faisst et al. 1995).

También se utilizaron los siguientes anticuerpos específicos del sistema VEGF:

- Anti-P6L (α -P6L). Anticuerpo policlonal de conejo que se generó contra el péptido PQRPLPQRPL 12-mer (un dímero del péptido P6L) acoplado a hemocianina de lapa californiana (KLP). Se administró por inyección (100 μ g/dosis) en una primera dosis emulsionada en adyuvante completo de Freund, seguido de dos inyecciones de refuerzo en adyuvante incompleto. El sangrado se realizó diez días después de la última inyección y el suero se purificó por afinidad (Nab proteína G; Thermo).
- Anti-A7R (α -A7R). Anticuerpo monoclonal de ratón comercial. α -VEGF (Sigma; V4758) que se une al VEGF nativo humano y que neutraliza su actividad biológica. Este anticuerpo se utilizó para identificar, por presentación de fagos, el péptido A7R anti-angiogénico (ATWLPPR de 7mer) que se une a la neuropilina-1 (Binétruy-Tournaire et al. 2000). Se utilizó el recombinante biológicamente activo de VEGF-A humano (Peprotech 100-20) para controlar la actividad del anticuerpo α -A7R.
- Anti-VEGFR-1 (α -VEGFR-1). Anticuerpo policlonal de conejo comercial (ReliaTech). Este anticuerpo se obtuvo utilizando como antígeno recombinante el dominio extracelular soluble humano del VEGFR-1.
- Anti-VEGFR-1 (α -VEGFR-1). Anticuerpo monoclonal de conejo comercial (ReliaTech). Este anticuerpo reconoce el VEGFR-1 humano, se generó utilizando el dominio extracelular recombinante de VEGFR-1 como antígeno.
- Anti-VEGF (α -VEGF). Anticuerpo policlonal de conejo comercial (BioVision). Específico para VEGF.

Otros anticuerpos primarios:

- Anti-actina. Anticuerpo policlonal de conejo comercial (Sigma-Aldrich) que reconoce de forma específica la proteína actina.

Los anticuerpos secundarios utilizados fueron los siguientes:

- Anti-conejo Texas Red (TXRD). IgG de conejo conjugada con el rojo Texas (Jackson ImmunoResearch). Este anticuerpo se utilizó a una dilución de 1/1000.
- Anti-conejo Cy5 (Alexa Fluor 647). IgG de conejo conjugada con Cy5 (RRID: AB_2536183). La dilución utilizada fue de 1/500.
- Anti-ratón FITC. IgG de ratón conjugada con isotiocianato de fluoresceína (FITC) (Jackson ImmunoResearch). La dilución empleada fue de 1/1000.
- Anti-conejo peroxidasa. IgG de conejo conjugadas con peroxidasa (Invitrogen).
- Anti-ratón peroxidasa. IgG de ratón conjugadas con peroxidasa (Jackson ImmunoResearch laboratories).

5.3. Inmuno-microscopía electrónica (ME).

Esta técnica fue llevada a cabo por Germán Andrés, del servicio de Microscopía electrónica del CBMSO. En breve, las partículas de virus se adsorbieron durante 15 min en rejillas de cobre recubiertas de carbón / colodión de descarga luminiscente, se lavaron con agua y se tiñeron negativamente durante 50 s con acetato de uranilo al 2 % antes de la visualización. Para el marcaje inmunológico con oro, las partículas adsorbidas por la rejilla se incubaron durante 30 min con los anticuerpos primarios a las diluciones indicadas en las leyendas de las figuras. Los anticuerpos unidos se marcaron durante 30 min con proteína A conjugada con partículas de oro de 5 nm (Laboratorio ME, Universidad de Utrecht, Utrecht, Países Bajos) o una IgG anti-ratón de cabra conjugada con partículas de oro de 5 nm (British Biocell International). Finalmente, las muestras se tiñeron negativamente con acetato de uranilo al 2 % y se visualizaron bajo un microscopio electrónico JEOL (Tokio, Japón) JEM-1010 equipado con una cámara TVIPS F416 (Gauting, Alemania).

5.4. Análisis de neutralización de virus con anticuerpos.

Se realizó este análisis para la interacción del anticuerpo mAb-B7 con el virus MVMp y con las quimeras Nd, Ps y NdPs. Se prepararon, por duplicado, diluciones en PBS con 0,1 % de FBS con diversas cantidades de virus purificados (38 UHA/P60 de MVMp, 240 UHA/P60 de Nd, 128 UHA/P60 de Ps y 224 UHA/P60 de NdPs), y se añadió a cada una de las diluciones anticuerpo anti-B7 a una concentración final de 1/50. Todas las diluciones fueron incubadas durante 30 min a temperatura ambiente y en agitación. Pasado este tiempo, se llevó a cabo la inoculación de las células durante una hora a 37 °C y en agitación. La infección de monocapas de células NB324K se realizó en placas P60

sembradas el día anterior con una densidad de $4 \cdot 10^5$ células por placa. Tras la adsorción del virus, las células fueron lavadas con PBS - 0,1 % de FBS y mantenidas durante 24 horas en el medio de cultivo correspondiente. Para determinar el grado de neutralización del virus se analizó la expresión de la proteína NS1 por citometría. Para ello, se levantaron las células con tripsina y se fijaron en suspensión con PFA al 4 % durante diez minutos, en oscuridad y con agitación orbital. Posteriormente las células fueron teñidas con el anticuerpo policlonal anti-NS1 a una concentración final 1/4000 y revaladas con anti-conejo Cy5 (647) a una concentración final 1/500 siguiendo el protocolo de citometría de flujo especificado en el apartado 6.2.

6. Técnicas de biología celular.

6.1. Inmunofluorescencia indirecta.

La inmunofluorescencia indirecta (IF) de doble marcaje se realizó con células sembradas sobre cubreobjetos de vidrio (0,17 mm de diámetro) y fijadas durante 10 min a temperatura ambiente, en oscuridad y con agitaciones regulares con paraformaldehído (PFA) al 4%. Las células fueron permeabilizadas a continuación durante 10 minutos, a temperatura ambiente y en agitación con tritón X-100 diluido al 0,1 % en PBS. Se realiza un bloqueo de uniones inespecíficas durante veinte minutos, también a temperatura ambiente y en agitación, con PBS - 0,1% tritón X-100 y 1% FBS, para seguidamente incubar las células durante una hora a 37 °C en una cámara húmeda con los anticuerpos primarios apropiados para cada caso diluidos en el mismo tampón del bloqueo. Posteriormente, se realizan cuatro lavados con PBS - tritón X-100 0,1 % en agitación durante cinco minutos cada uno y se incuban las células con los anticuerpos secundarios apropiados en las mismas condiciones que con los primarios. Se lavan las células con tritón 0,1% diluido en PBS de nuevo y, finalmente, se sumergen los cristales en PBS y en agua destilada en repetidas ocasiones y se montan sobre portaobjetos (76 x 26 mm) con Fluoromount-G - DAPI. El montaje se mantiene durante toda la noche a temperatura ambiente y en oscuridad antes de su visualización en un microscopio vertical Axio Imager M1 (Zeiss) acoplado a cámara ccd Coolsnap FX monocroma, o con un microscopio invertido Axiovert200 (Zeiss) acoplado a una cámara sCMOS monocroma. Las imágenes se obtubieron a través de un microscopio de barrido láser confocal LSM710 acoplado a un microscopio invertido AxioObserver (Zeiss) y fueron procesadas por medio del paquete FIJI-ImageJ (Fiji: an open-source platform for biological-image analysis), tomando como referencia las muestras control para cada uno de los casos.

6.2. Citometría de flujo.

Esta técnica se realizó con células fijadas en suspensión durante 10 min con PFA al 4 %, en oscuridad y agitación. A continuación, se procedió a permeabilizar las células durante 10 min a temperatura ambiente con PBS - Tritón X-100 0,1 %, seguido de bloqueo durante 20 min a temperatura ambiente y agitación en PBS - 0,1 % Tritón X-100 - 1 % FBS. Las células se incubaron a continuación durante una hora a 37 °C con los anticuerpos primarios correspondientes diluidos en tampón de bloqueo, se lavaron varias veces en exceso de volumen con PBS - 20 % FBS, se incubaron de nuevo durante 1 hora a 37 °C con los anticuerpos secundarios adecuados diluidos en el mismo tampón de bloqueo, y finalmente se volvieron a lavar en PBS - 20 % FBS.

El análisis citométrico de las células se realizó a través de un equipo FACSCanto II Flow Cytometer con la ayuda del software FlowJo (vs9.3), excluyendo los restos tras delimitar regiones celulares en base a los parámetros FSC y SSC que indican respectivamente tamaño y complejidad, y utilizando un mínimo de 20.000 eventos por muestra.

7. Análisis de proteínas.

7.1. Aplicación directa sobre membrana (Slot blot).

El análisis de slot blot al vacío fue realizado siguiendo las recomendaciones del fabricante (Hoeffer) utilizando para ello membranas de nitrocelulosa (Scheider y Schull). Las muestras se aplicaron en condiciones nativas diluidas en PBS (Figura 10B y Figura 12), o en condiciones desnaturalizadas diluidas en PBS con 0,1 % SDS para una mejor cuantificación de las VPs. Tras la aplicación y el secado se continuó con el protocolo de inmunodetección detallado en el apartado 7.2.

7.2. Western-blot.

Se aplica el término Western-blot para designar la combinación de las técnicas; electroforesis SDS-PAGE, transferencia a membrana, e inmunodetección con anticuerpos. Para ello, las muestras desnaturalizadas por ebullición durante 5 minutos en el tampón de carga Laemli (10 % glicerol, 5 % β -mercaptoetanol, 0,002 % azul de bromofenol, 0,5 M Tris HCl pH 6,3 y 0,4 % SDS), fueron sometidas a electroforesis en geles desnaturalizantes de poli(acrilamida/bis-acrilamida 29:1 (Sigma)) al 8 % (SDS-PAGE) en tampón Tris-Glicina (25 mM Tris (Serva), 192 mM Glicina (Gibco) y 0,1 % SDS). La electroforesis tuvo lugar a 4 °C durante 2-3 horas a 100 V. El marcador de peso molecular utilizado fue el Prestained SDS-PAGE Standards, Broad Range" (Biorad). Una vez completada la electroforesis,

las muestras fueron transferidas a una membrana de nitrocelulosa (Scheider y Schull) en tampón de transferencia (Tris base 25 mM, glicina 192 mM, 0,1 % de SDS y 20 % de metanol) durante 55 min a 4 °C y 100 V empleando una cubeta *Mini-PROTEAN Tetra Cell* de Bio-Rad. A continuación, las membranas fueron bloqueadas con TBS-T (Tris pH 7,5 20 mM, 140 mM NaCl, 0,1 % Tween 20) con 10 % FBS durante una hora a temperatura ambiente, lavadas con TBS-T dos veces durante 15 min, e incubadas seguidamente con el anticuerpo primario correspondiente durante toda la noche a 4 °C diluido en el tampón TBS-T - 1 % FBS - 1 % NP40. Tras varios lavados con exceso de TBS-T, las membranas se incubaron con los anticuerpos secundarios apropiados durante una hora a temperatura ambiente en el mismo tampón empleado para los primarios. Finalmente, las membranas lavadas con exceso de TBS-T se revelaron con el sistema ECL (Enhanced Chemiluminescence, Amersham) siguiendo las indicaciones del fabricante, la señal fue captada con el equipo Amersham Imager 680 blot y el software asociado al mismo. La densidad de las bandas se determinó con el paquete de procesamiento de imágenes FIJI-ImageJ (Fiji: an open-source platform for biological-image analysis).

7.3. Inmunoprecipitación *in vitro* con *Sepharosa*.

Las muestras sometidas a este ensayo se dividieron en una serie de alícuotas equivalentes, incluyendo la muestra de partida (o *input*), al que se añadió tampón de Laemli y se congeló hasta su uso. El resto de las muestras se clarificaron por centrifugación (15 min, 4 °C en microcentrífuga) y les añadió el anticuerpo correspondiente en cada caso con el que se incubaron a 4 °C durante toda la noche. Pasado este tiempo, se les añadió por cada 0,5 mL de suspensión 150 µl de *sepharosa* lavada extensamente en PBS – 10 % FBS y diluida al 10 % en PBS. Las muestras se incubaron 2 horas a 4 °C en agitación, seguido de tres lavados de la *sepharosa* con un exceso de PBS (centrifugando dos minutos a 9K y retirando el sobrenadante), para tras el último lavado resuspender los sedimentos con tampón Laemli 1,2X. Finalmente, se procedió a la realización de un western-blot siguiendo el protocolo indicado en el apartado 7.2, en el que se aplicaron los *inputs* en cantidad equivalente al de las muestras procesadas.

8. Tropismo del MVMP y de virus quiméricos.

El tropismo de los virus quiméricos hacia células NB324K y U373 MG se determinó analizando su capacidad de infección relativa por IF. Para ello, se inocularon monocapas de ambos tipos celulares sembradas sobre cubreobjetos de vidrio, a una densidad de $2,5 \cdot 10^5$ células / P60. Al día siguiente se transfirieron los cubreobjetos a placas M24 y se dejaron un día más en cultivo para una correcta aclimatación celular. Una vez se habían seleccionado al microscopio aquellos cristales que presentaban monocapas homogéneas y equivalentes, se procedió a la inoculación de ambos tipos celulares en

triplicado con los virus MVMp, Nd, Ps y NdPs diluïdos en PBS⁺⁺ - 0,1 % FBS en las cantidades seriadas de UHA indicadas en la Figura 19. Para la adsorción, los inóculos de virus se incubaron una hora a 37 °C en agitación, tras lo cual se lavaron las células con PBS⁺⁺ - 0,1 % FBS, y se añadió el medio de cultivo correspondiente a cada tipo celular. La incubación de la infección se detuvo a las 20 hpi mediante fijación con PFA 4 % durante diez minutos en oscuridad y agitación regular. Finalmente, las células se lavaron con PBS, se tiñeron mediante IF con el anticuerpo anti-NS1 a una concentración final 1/500 y se revelaron con anti-conejo TXRD 1/500 siguiendo el protocolo detallado en el apartado 6.1. El tropismo se determinó en base a la relación de células NS1⁺ entre ambos tipos celulares.

9. Análisis del uso de VEGFR-1 en la unión de virus quiméricos.

Se estudió si la quimera Nd presentaba un tropismo modificado debido a una posible unión con el receptor VEGFR-1. Para ello, se incubaron en 250 µl de PBS⁺⁺ 1,4·10¹² partículas de viriones purificados (corresponden a 6,4 UHA de wt y 1,6 UHA de Nd; 10⁻⁵ mM para una masa molecular del virión 3,340 kDa) media hora a 37 °C y en agitación con 9 µg/mL (0,12 mM) y 1,4 µg/mL (0,019 mM) de receptor soluble sVEGFR-1 (ReliaTech; masa molecular 72 kDa). Estas mezclas, que se corresponden con un exceso de hasta 5 veces más moléculas de sVEGFR-1 con respecto a viriones de MVMp y Nd, se inocularon (100 µl / pocillo) sobre células NB324K y U373 MG sembradas en pocillos de M24. El ensayo de unión se realizó durante 1 hora a 37 °C en agitación, tras el cual se recogieron sobrenadantes (virus no unido) y extractos celulares (virus unido) para analizar los niveles de proteínas VPs por western-blot utilizando el anticuerpo primario α-VP (1/5000). También se determinó en las mismas muestras los niveles de sVEGFR-1 en el sobrenadante y asociado a células, con el anticuerpo α-VEGFR-1 (1/200). Como control de bloqueo de la unión se usó el anticuerpo monoclonal anti-B7 (1/100), y como control de la actividad de sVEGFR-1 se determinó su capacidad de unión a su ligando específico de VEGF. Para ello, una solución de 4 µg/mL de VEGF y 5 µg/mL sVEGFR-1 (ReliaTech) en PBS fue dividida en tres volúmenes iguales, y se procedió a una inmunoprecipitación con *sepharosa* empleando anticuerpos específicos α-VEGF y α-VEGFR-1 a una concentración final 1/40 según el protocolo detallado en el apartado 7.3.

En un control paralelo nos planteamos si residuos de ácido siálico, que actúan como receptores del MVM y pudieran estar presentes en el sVEGFR-1 recombinante glicosilado, podrían prevenir su unión con la quimera Nd. Para explorar esta posibilidad, se trató en duplicado con Neuraminidasas (ver más abajo) 2,4 U de la NA α2-3 y 15 U de la NA α2-3,6,8 en una solución de 50 µl de PBS⁺⁺ que contenía 0,3 µg de sVEGFR-1 durante 30 min a 37 °C en agitación. A continuación, se añadieron a estas soluciones 3·10¹² partículas de MVMp o de Nd purificados en un volumen de 100 µl y se incubaron media hora a 37 °C en agitación, antes de ser inoculadas sobre células NB324K y U373 MG para ensayar

su adsorción durante una hora a 4 °C. Los extractos celulares se recogieron 20 hpi en tampón Laemli y los niveles de la proteína NS1 se analizaron por SDS-PAGE y western-blot utilizando como anticuerpo primario anti-NS1 y revelando con anti-conejo peroxisasa ambos a una concentración 1/10000.

10. Análisis del ácido siálico en la unión e infección del MVMP y de la quimera Nd.

Se estudió la unión determinando los niveles de proteínas estructurales (VPs) unido a las células tras 1 hora de adsorción, y la infección midiendo la expresión de NS1 a las 24 hpi en western-blot. La implicación de ácido siálico en ambos procesos se terminó por tratamientos con las neuraminidasas (NA) α 2-3 S y α 2-3,6,8 (New England BioLabs). La NA α 2-3 S es una exoglucosidasa altamente específica que cataliza la hidrólisis de los residuos N-acetilneuramínico (o ácido siálico) unidos por enlaces α 2-3 a otros oligosacáridos presentes en glicoproteínas y glicolípidos; y la NA α 2-3,6,8 es una sialidasa que cataliza la hidrólisis de residuos de ácidos N-acetilneuramínicos con enlaces α 2-3, α 2-6 y α 2-8 que pertenecen a glicoproteínas y oligosacáridos. Estas NA se emplearon con las dosis indicadas en las figuras, diluidas en PBS⁺⁺ en un volumen de 50 μ l/pocillo (excepto los ensayos de infección de la Figura 21A y B izquierda, que se incubaron en un volumen de 40 μ l / pocillo) y se dejaron actuar una hora a 37 °C en agitación. Sin retirar las NAs se añadieron $8 \cdot 10^{12}$ partículas de virus purificado por pocillo de M24 en un volumen final de 50 μ l en PBS⁺⁺ y se dejó adsorción durante 45 min a 37 °C en agitación. Los extractos celulares se tomaron a tiempo 0 hpi para el ensayo de unión y a tiempo 20 hpi para el ensayo de infección. En pruebas controles infectando en condiciones similares 5 horas tras los tratamientos con las NAs, se determinó que estos no afectan a la viabilidad celular y no impiden la infección productiva (datos no mostrados). Las muestras se analizaron por medio de SDS-PAGE y western-blot utilizando los anticuerpos primarios α -VP y α -NS1 a una concentración final de 1/5000 y 1/10000 respectivamente y revelando con anti-conejo y anti-ratón peroxidasa a una concentración 1/10000. El análisis de densitometría de los western-blots respectivos se realizó con el paquete de procesamiento de imágenes FIJI-ImageJ y el análisis de datos junto y gráficas fueron realizados con el programa Microsoft Excel. Para algunas condiciones experimentales se confirmó la importancia del siálico en la infección de los virus MVMP y Nd por citometría (ver Figura 22) siguiendo el protocolo detallado en el apartado 6.2.

11. Cinética de unión del MVMP y de la quimera Nd a células NB324K.

Con el objetivo de determinar la capacidad de unión del virus MVMP y de la quimera Nd a células NB324K a lo largo de tiempo, se inocularon a 4 °C por triplicado células NB324K (aprox. 10^5) con

$8 \cdot 10^{12}$ partículas por pocillo de M24 de viriones de MVMP o Nd purificados diluidos en 100 μl de PBS⁺⁺. Los extractos celulares fueron recogidos con Laemli a los distintos tiempos de unión que se indican en la Figura 24A y se procedió a su análisis con el protocolo de western-blot detallado en el apartado 7.2 utilizando el anticuerpo primario α -VP a una concentración final 1/5000 y revelando con anti-conejo peroxidasa 1/10000. El análisis de densitometría de los western-blots se realizó con el paquete de procesamiento de imágenes FIJI-ImageJ y el análisis de datos junto y gráficas con el programa Microsoft Excel.

12. Procesamiento VP2 / VP3 durante la entrada de MVMP y de Nd y su modulación por neuraminidasa.

Para determinar si existen o no diferencias significativas en el procesamiento de la proteína VP2 / VP3 de los virus MVMP y Nd, se inocularon a 37 °C (por triplicado) células NB324K y U373 MG usando un total de $8 \cdot 10^{12}$ partículas purificadas de los virus MVMP y Nd por pocillo de M24, diluidas en 100 μl de PBS⁺⁺. Pasado este tiempo de adsorción, los extractos celulares se recogieron tras 2,5 hpi en tampón Laemli.

Por otra parte, de forma previa a la inoculación y también por triplicado, se realizó un tratamiento durante 30 min y a 37 °C de las células NB324K con 0,6 U de la neuraminidasa α 2-3 S en un volumen de 50 μl /pocillo de M24. A continuación, se inocularon durante 30 min a 37 °C en cada uno de los pocillos $8 \cdot 10^{12}$ partículas de MVMP y de Nd diluidas en 50 μl de PBS⁺⁺. Acabada la adsorción se retiraron los inóculos, se añadió el medio de cultivo correspondiente, y los extractos celulares se recogieron 2,5 hpi en tampón Laemli 1,2X. Las muestras recogidas fueron procesadas por western-blot según lo detallado en el apartado 7.2 utilizando el anticuerpo primario α -VP a una concentración final 1/5000 y revelando con anti-conejo peroxidasa 1/10000. El análisis de densitometría de las cantidades de proteína VP2 y VP3 en cada condición se realizó con el paquete de procesamiento de imágenes FIJI-ImageJ y los datos fueron procesados por el programa GraphPad Prism vs.8.

RESULTADOS

1. Tolerancia funcional de la cápsida del MVMp a dos VEbp que sustituyen residuos de la espícula (eje de simetría 3X).

1.1. Virus quiméricos MVM-VEbp que poseen los péptidos A y P insertados en la espícula.

Mediante diseño racional, se construyeron quimeras del virus MVM manipulando la cápsida por ingeniería genética en la huella de un anticuerpo neutralizante (B7-mAb) que se une a un epítipo prominente de la espícula, localizada en el eje de simetría 3X (Kaufmann et al. 2007).

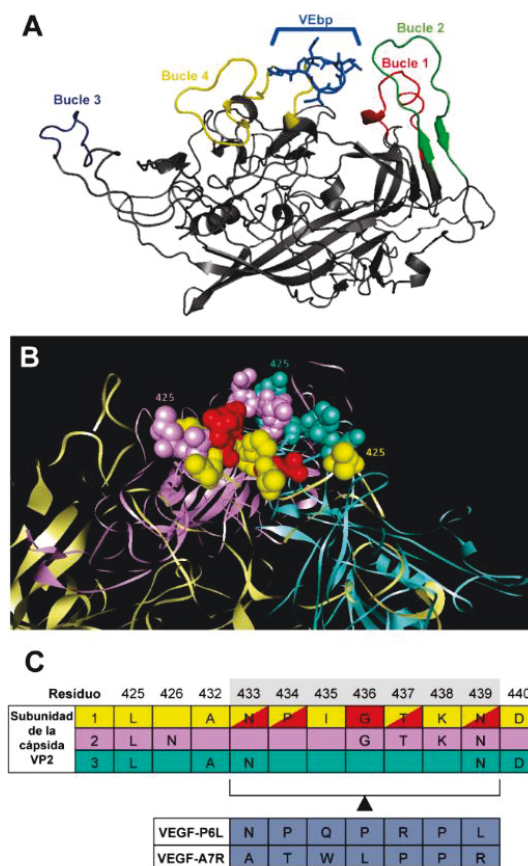


Figura 7. Ingeniería genética de la espícula de la cápsida del MVM con VEbp. (A) Estructura de la subunidad VP2 ensamblada en la cápsida del MVM (Kontou et al. 2005) en la cual se muestran el bucle 1 (rojo), el bucle 2 (verde), bucle 3 (azul oscuro) y el bucle 4 (amarillo). Los péptidos del bucle 4 reemplazados por péptidos heterólogos VEbp en los virus quiméricos se muestran en azul claro y con una representación en barras. (B) Configuración de los residuos del bucle 4 que fueron reemplazados por VEbp. El código de colores y la representación es la siguiente: con forma de bolas los residuos que establecen contactos con el B7-mAb (Kaufmann et al. 2007); en amarillo, azul claro y rosa los residuos de cada una de las tres subunidades que forman la espícula de la cápsida y, en rojo, los residuos seleccionados en los mutantes MAR (López-Bueno et al. 2003) (ilustrados en una sola subunidad). (C) Distribución de los aminoácidos del bucle 4 en las tres subunidades proteicas de VP2 que conforman la espícula. Los residuos reemplazados por VEbp se indican en la parte inferior. El código de colores es el mismo que en el panel superior excepto para los residuos marcados en amarillo y rojo que son aquellos que contactan con el B7-mAb y que fueron seleccionados en los mutantes MAR. El software usado fue PyMol. El número de acceso del PDB (Protein Data Bank) para el VP2 del MVMp es **1z14**.

La espícula es un dominio muy estructurado configurado por tres subunidades entrelazadas de la cápsida (Kontou et al. 2005; Tsao et al. 1991), y el epítipo que reconoce B7-mAb tolera la selección de mutantes de escape resistentes (MAR) tanto *in vitro* como *in vivo* (López-Bueno et al. 2003).

Los residuos 433-NPIGTKN-439 (nombrado como VP2) en las tres subunidades de proteínas entrelazadas que componen el bucle 4 de la espícula expuesto en la superficie de la cápsida (Figura 7A) y que delimitan el epítipo neutralizante que reconoce B7-mAb (Figura 7B), fueron reemplazados alternativamente por uno de los dos VEbp anti-angiogénicos A7R y P6L (Figura 7C). Estos virus quiméricos (MVM-A7R y MVM-P6L) fueron construidos en un clon molecular de la cepa prototipo (p) de MVM (denominada MVMp) (Merchlinsky et al. 1983), y los stocks de virus preparados y purificados de las transfecciones fueron confirmados por secuenciación Sanger (ver material y métodos).

1.2. Impacto de los VEbp heterólogos en el ciclo vital del MVM.

Para analizar los efectos de los VEbp en el ciclo viral, estudiamos la capacidad de infección productiva de las quimeras MVM-VEbp en cultivo. Los clones genómicos de las quimeras (pMVM-P6L y pMVM-A7R) y de la cepa salvaje (wt) (pMVMp) fueron transfectados en fibroblastos transformados humanos NB324K que son muy permisivos al MVM, y los cultivos fueron monitorizados para la expresión de proteínas estructurales (VP) a lo largo del tiempo (Figura 8A). Las transfecciones con el wt produjeron virus que se extendieron rápidamente en cultivo y cuyo rendimiento en células VP⁺ fue cercano al 100 %. El efecto citopático (CPE) fue patente a las 120 horas post-transfección (hpt). La quimera pMVM-P6L produjo una cinética de infección similar, aunque más lenta, y también CPE significativo a partir de las 120 hpt. En los cultivos pMVM-A7R sin embargo, aunque mostraron porcentajes comparables a los anteriores de células VP⁺ a las 48 hpt, no se observó una progresión de la infección significativa incluso a tiempos largos post-transfección.

A continuación, investigamos si el bajo rendimiento de MVM-A7R podría deberse a un deterioro de la replicación del ADN viral mediado por la secuencia A7R. Para ello, se aisló el ADN de bajo peso molecular de las células NB324K transfectadas por los clones genómicos virales y se sometieron a un análisis de Southern-blot. Como se muestra en la Figura 8B, los plásmidos wt y los plásmidos quiméricos inducen la correcta síntesis de formas virales replicativas intermedias (RF-I y RF-II). Fue importante demostrar que las especies de ADN monocatenario asociadas al empaquetamiento genómico en cápsidas virales maduras solo fueron resueltas en células transfectadas con pMVMp y con pMVM-P6L (Tullis et al. 1993). Este experimento demostró que A7R perjudica el rendimiento de genoma viral empaquetado.

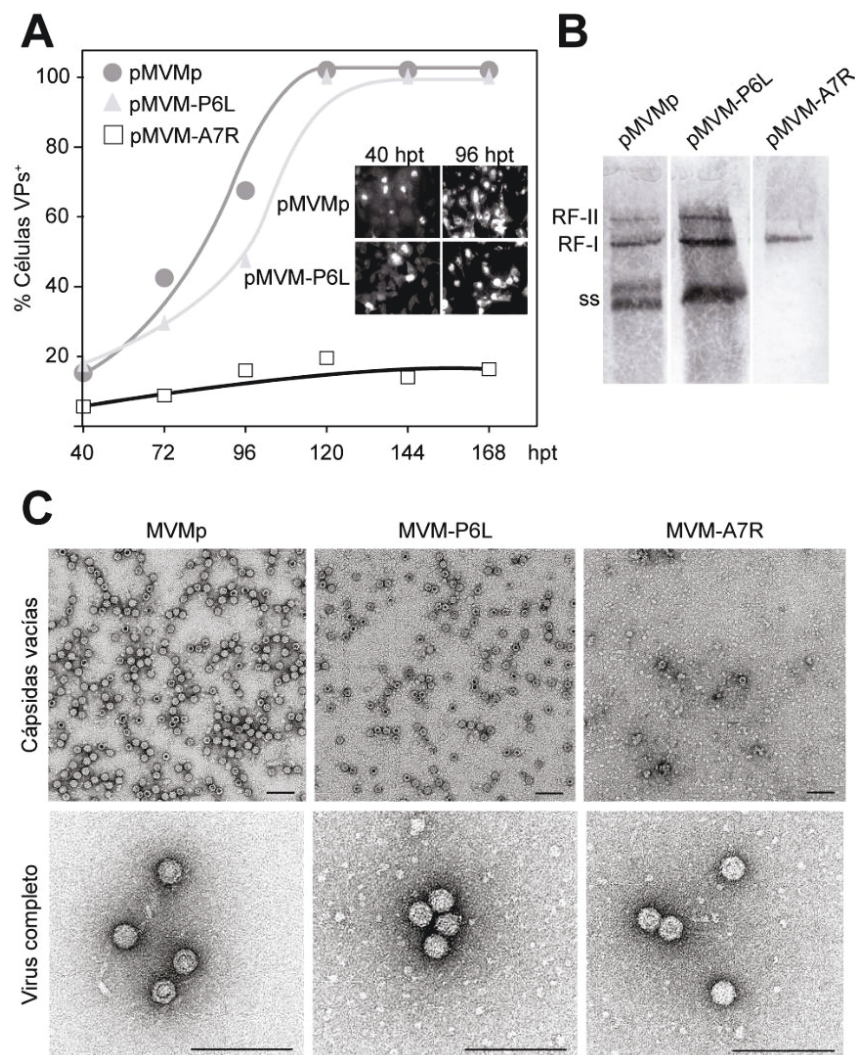


Figura 8. Impacto de VEBp en el ciclo viral infeccioso del MVM. (A) Representación gráfica del porcentaje de células NB324K que expresan VPs tras la transfección con los plásmidos genómicos MVMp, MVM-P6L y MVM-A7R. En el recuadro se muestra un experimento representativo, de tres ensayos independientes, de la inmunotinción de VPs del wt y del plásmido pMVM-P6L. **(B)** Replicación del genoma de MVMp, MVM-P6L y MVM-A7R obtenidos tras 48 hpt a partir de 10^6 células NB324K transfectadas. El ADN de bajo peso molecular fue resuelto en gel de 1 % agarosa e hibridado por Southern blot con una sonda MVM de longitud completa (experimento realizado por la Dra. Sánchez-Martínez). RF-I y RF-II, intermediarios replicativos; ss, genoma viral monocatenario. **(C)** Partículas virales quiméricas vacías y llenas de ADN (viriones) obtenidas a partir de la transfección directa de células NB324K. Las imágenes muestran campos representativos de varias purificaciones. Los viriones MVM-A7R se obtuvieron de una preparación concentrada $\times 100$. Las barras de escala corresponden a 100nm. Preparación de muestras e imágenes obtenidas por el Dr. Germán Andrés (CBMSO).

Seguidamente analizamos el efecto de los VEBp en la producción de partículas virales. Tras realizar transfecciones a gran escala (Sánchez-Martínez et al. 2012) para cada uno de los clones infecciosos, se inspeccionaron al ME el rendimiento de cápsidas vacías y viriones llenos de ADN purificados a partir de cantidades equivalentes de células procesadas a las 48 hpt., (Figura 8C). Se obtuvieron cantidades similares de cápsidas vacías y viriones en transfecciones con los plásmidos pMVMp y pMVM-P6L, ambos tipos de partículas mostraron una morfología similar de 25 nm de diámetro. Sin embargo, en las

transfecciones con el plásmido pMVM-A7R, la recuperación de partículas virales fue mucho menor y las fracciones de gradientes de CsCl correspondientes a la densidad de proteína mostraron muy pocas cápsidas de MVM-A7R vacías pero grandes cantidades de agregados. Además, en las fracciones correspondientes a la densidad del virión con ADN empaquetado no se observaban partículas en una inspección preliminar al ME, si bien se pudo demostrar su presencia con un tamaño y morfología normales tras la concentración de las fracciones por centrifugación (Figura 8C, abajo a la derecha).

1.3. Efecto del péptido A7R insertado en el eje 3X sobre el ensamblaje de la cápsida del MVM.

A continuación, procedimos a investigar si la baja recuperación de partículas virales en transfecciones impuestas por el péptido A7R (Figura 8C) pudieron ser originadas por una alteración estructural creada en la cápsida. Para ello, comparamos los patrones de ensamblaje de la cápsida del MVMp y del MVM-A7R por análisis de sedimentación a través de gradientes de sacarosa. Extractos de células transfectadas con los plásmidos genómicos infecciosos (Figura 9A) fueron analizados por sedimentación bajo condiciones que resuelven tanto las partículas del MVM como los intermediarios de ensamblaje. El patrón de ensamblaje del MVMp (Figura 9A, abajo) muestra una distribución de las VP con acumulación principal correspondiente a la sedimentación de las cápsidas vacías (70S), que sucede a un valor de S ligeramente menor al pico de infectividad correspondiente al virus lleno de ADN (110S).

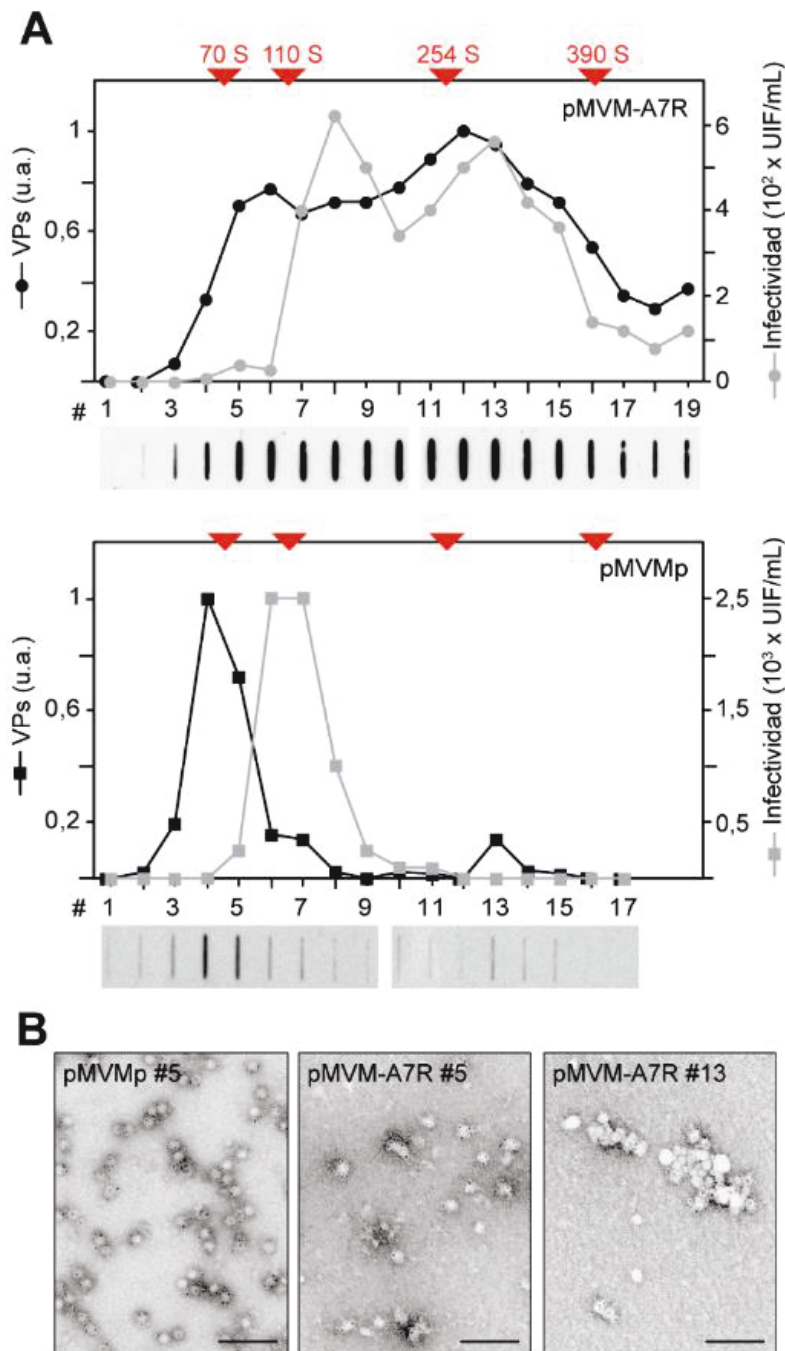


Figura 9. Patrón de ensamblaje del virus quimérico MVM-A7R. (A) Extractos de células NB324K transfectadas con los plásmidos genómicos indicados recogidos 48 hpt y analizados por sedimentación durante 1 hora a 4 °C en gradientes de sacarosa del 5% al 30%. Se muestra la distribución de las proteínas de la cápsida (VP) en las fracciones del gradiente, analizadas por slot-blot con el anticuerpo α -VP. u.a. indican las unidades arbitrarias de densitometría. En paralelo se estudió la distribución de la infectividad en las fracciones por un ensayo de UIF. Se muestran valores medios de dos determinaciones independientes. (B) Análisis por ME con inmuno-oro de la presencia de partículas virales y ensamblados de MVM en las fracciones seleccionadas de gradientes de sacarosa. El anticuerpo primario fue α -cápsidas de MVM de conejo a una dilución de 1:5. Las barras de escala corresponden a 100nm. Preparación de muestras e imágenes obtenidas por el Dr. Germán Andrés (CBMSO).

Por el contrario, las subunidades de las VP quiméricas y la infectividad resultante de dos transfecciones independientes con pMVM-A7R se distribuyeron consistentemente a través de un amplio rango de valores S (Figura 9A, arriba). Se observó una acumulación significativa de VP en fracciones correspondientes a tamaños de partículas del MVM normales, pero también en fracciones con valores de sedimentación próximos a 254S correspondientes a entidades moleculares de mucho mayor tamaño. Este patrón de sedimentación inesperado, que podría sugerir la presencia de partículas supravirales MVM-A7R, fue cuidadosamente inspeccionado al ME mediante inmuno-tinción con el anticuerpo anti-MVM y partículas de oro. Como se ilustra en la Figura 9B para fracciones de gradientes con distintos valores de S, este análisis no evidenció la presencia de partículas supravirales ni de grandes ensamblajes regulares. Al contrario, las marcas de oro aparecían confinadas en partículas virales de tamaño normal embebidas en agregados proteicos o en VPs mal ensambladas. Estos análisis demostraron que A7R perjudica el ensamblaje de la cápsida del MVM.

2. Exposición de los VEbp en la superficie de la cápsida del MVM.

2.1. Análisis de la configuración de los VEbp en la superficie de cápsidas quiméricas.

La exposición y configuración de los VEbp heterólogos fueron estudiadas por su interacción con anticuerpos específicos en células e *in vitro*. En primer lugar, se analizó la expresión y la localización subcelular de las VP (proteínas virales estructurales) en células NB324K transfectadas con clones genómicos del wt y de las quimeras-VEbp (Figura 10A). La tinción de inmunofluorescencia (IF) con antiseros policlonales de cápsidas α -MVM muestran la acumulación de las proteínas quiméricas en el núcleo con una eficiencia comparable a la del wt, indicando que los VEbp no afectan a la translocación nuclear de las VP. El B7-mAb marca la formación de cápsidas nucleares de MVMp (Gil-Ranedo et al. 2015), pero no reconocía las partículas virales quiméricas tal y como se esperaba debido al reemplazo genético del epítipo B7 (Figura 7). El anticuerpo policlonal α -P6L reconoció las subunidades de VP en las transfecciones con pMVM-P6L sin señales significativas en células que expresan VPs del wt y de A7R. El reconocimiento de las subunidades de VP-A7R por el anticuerpo monoclonal α -A7R fue significativo y específico, aunque la tinción fue detectada solo en unas pocas células que expresaban VP y usando una alta concentración del anticuerpo (Figura 10A, abajo a la derecha).

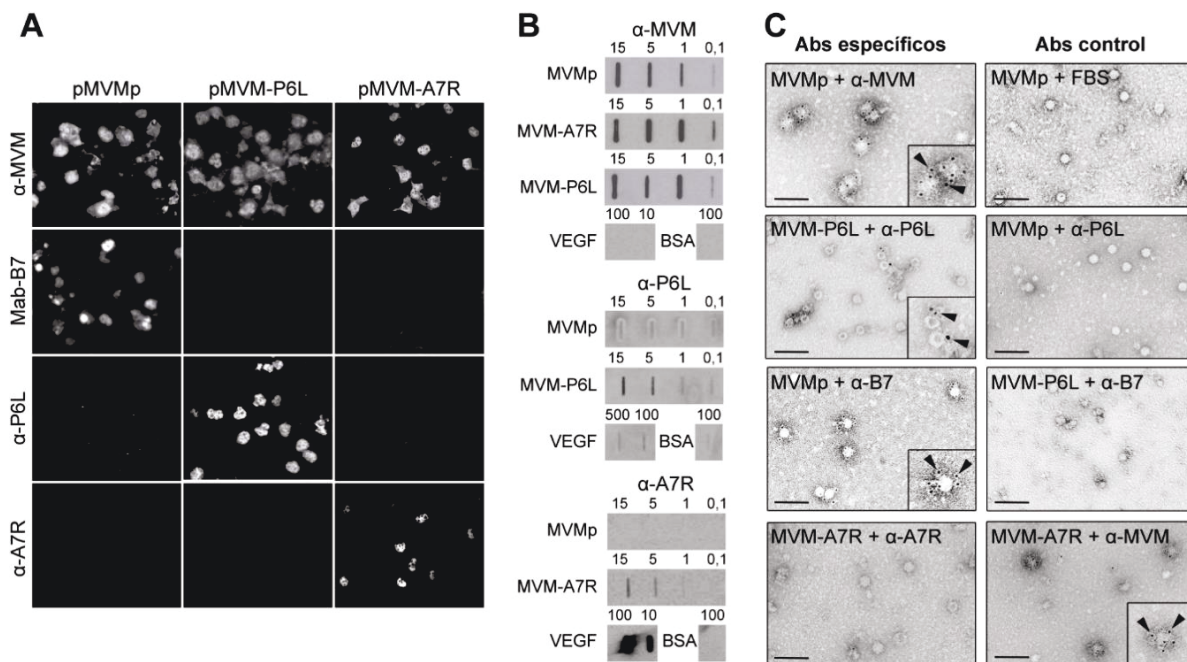


Figura 10. Reconocimiento por anticuerpos de los VEGb en las cápsidas quiméricas. (A) IF confocal que muestra la expresión y la localización subcelular de las proteínas VP del wt y de los virus quiméricos en células transfectadas teñidas con los anticuerpos anti-cápsida (α -MVM), B7-mAb y anticuerpos específicos anti-VEbp. El campo de células en las imágenes del plásmido pMVM-A7R con las tinciones α -MVM y α -A7R son los mismos. Este experimento se realizó con la colaboración de la Dra. Grueso. (B) Análisis de la exposición en la superficie de la cápsida de los VEGb en partículas virales purificadas por slot-blot. Diluciones seriadas de viriones purificados o de proteínas marcadoras fueron aplicadas sobre membranas de nitrocelulosa en PBS e incubadas con los anticuerpos indicados. Las cantidades de viriones y de proteínas se indican en nanogramos. (C) Micrografías de ME de viriones quiméricos que portan VEGb teñidos por inmuno-oro. Se muestran campos representativos de viriones purificados teñidos con los anticuerpos indicados, que fueron revelados por proteína A o IgG anti-ratón conjugados con partículas de oro de 5 nm. Las diluciones de anticuerpo usadas fueron de 1:5 en el caso del α -MVM, 1:25 para B7-mAb y de 1:2 para α -P6L y α -A7R. En los recuadros pequeños se han magnificado con puntas de flecha partículas de oro que decoran a los viriones. Las barras de escala corresponden a 100 nm. Preparación de muestras e imágenes obtenidas por el Dr. Germán Andrés (CBMSO).

El análisis de la exposición de los VEGb en la superficie de las cápsidas se abordó utilizando viriones llenos de ADN purificados. Es importante destacar que mientras que los viriones wt y MVM-P6L se pudieron obtener en cantidades suficientes a partir de transfecciones a gran escala de cultivos a los 4 dpt, para obtener cantidades suficientes de los viriones MVM-A7R se requirieron subcultivos de dos semanas a partir de células transfectadas. Una vez producidos y purificados (ver Materiales y Métodos) los viriones se analizaron mediante dos métodos. En un primer ensayo por slot-blot, los viriones se unieron a filtros de nitrocelulosa en condiciones nativas y se tiñeron con anticuerpos específicos (Figura 10B). Como control del método se empleó VEGF nativo, que fue reconocido muy débilmente por el anticuerpo α -P6L, en consistencia con la ausencia de interacciones inmunes en el método original usado para seleccionar el péptido P6L (Giordano et al. 2001), pero intensamente por el anticuerpo α -A7R monoclonal seleccionado por su capacidad de unir y neutralizar eficientemente el VEGF nativo (Binétruy-Tournaire et al. 2000). Tanto el wt como los dos virus quiméricos mantenían algunos epítomos

conformacionales que permitían un reconocimiento similar por el antisuero policlonal (anti-MVM) preparado frente a la cápsida del MVM. Fue importante observar cómo en estos ensayos los VEbp fueron detectados por los correspondientes anticuerpos específicos, aunque la señal para el A7R fue débil.

Para evitar una interpretación incorrecta de la exposición de los péptidos VEbp debido a posibles distorsiones estructurales inducidas por la unión de las cápsidas quiméricas al filtro, la capacidad de reconocimiento específico de los anticuerpos fue analizada también por un marcaje inmune con oro de los viriones unidos a rejillas. Al analizar los niveles de tinción al ME (Figura 10C), se observaron las partículas de MVMp profusamente decoradas con oro por los anticuerpos α -MVM y B7-mAb, mientras que, como era de esperar, este último anticuerpo falló a la hora de reconocer los viriones quiméricos. Es importante destacar que los viriones MVM-P6L fueron, de nuevo, específicamente reconocidos por el anticuerpo α -P6L, aunque la relación de partículas de oro por virión fue bajo. En contraposición, el anticuerpo α -A7R falló a la hora de marcar los viriones MVM-A7R en múltiples ensayos, si bien el anticuerpo α -MVM marcaba intensamente a estos viriones (Figura 10C, abajo). En resumen, estos análisis por ME confirmaron la exposición eficiente en la superficie de la cápsida y el reconocimiento inmune del péptido P6L en los viriones quiméricos, pero también aportaron evidencias sobre distorsiones estructurales del péptido A7R impuestas por las subunidades entrelazadas en el eje 3X de la cápsida, que limitaban su reconocimiento inmune.

2.2. Resistencia a la neutralización por anticuerpos específicos de los virus quiméricos MVM-VEbp.

Posteriormente, analizamos si los VEbp expuestos en la superficie de la cápsida alteran la neutralización de la infectividad de los virus quiméricos por anticuerpos específicos (Figura 11). El MVMp y los virus quiméricos fueron eficientemente neutralizados a altas concentraciones del antisuero policlonal α -MVM, mientras que el B7-mAb solo pudo bloquear la infección del wt, tal y como se describió previamente (Kaufmann et al. 2007; López-Bueno et al. 2003), fallando al neutralizar los virus quiméricos incluso a altas concentraciones.

Por otro lado, el anticuerpo α -A7R no mostró ninguna capacidad de neutralización incluso a altas concentraciones contra distintos stocks de MVM-A7R (Figura 11), en contraste con el efecto de altas concentraciones del anticuerpo policlonal α -P6L que sí disminuyeron específicamente la infección de MVM-P6L. Estos resultados demuestran la posibilidad de modificar, por medio de ingeniería genética, la huella de un anticuerpo en el eje 3X de la cápsida con péptidos heterólogos, que expuestos en la superficie de la cápsida confieren la capacidad de evadir la neutralización por anticuerpos α -MVM.

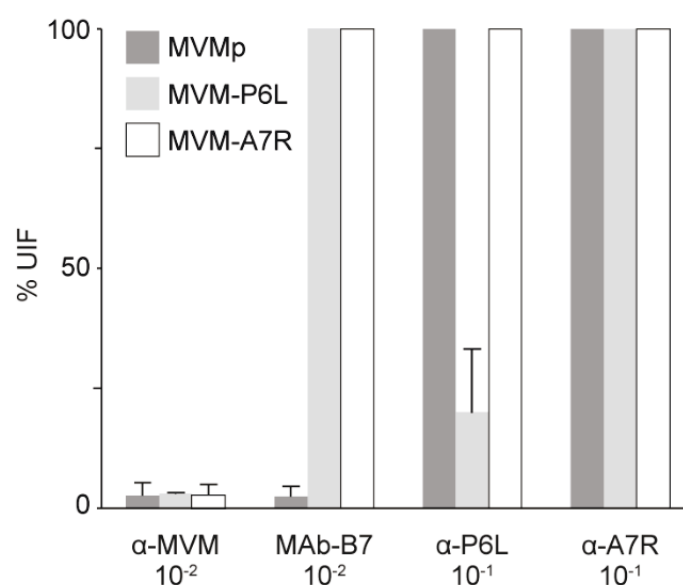


Figura 11. Evasión de las quimeras MVM-VEbp de la neutralización por anticuerpos específicos. Los virus se incubaron durante 30min en PBS con los anticuerpos indicados y se inocularon en células NB324K. La infectividad de los virus fue determinada por el número de células que expresan VP (UIF) 20 horas post-inoculación. Los valores son medias y errores estándar de cinco determinaciones.

2.3. Inmunogenicidad en ratón de los péptidos presentados en cápsidas quiméricas MVM-VEbp.

Para ensayar la inmunogenicidad de los VEbp insertados en la cápsida del MVM, inyectamos intraperitonealmente (i.p.) ratones BALB/c con cápsidas MVM-A7R vacías sin adyuvante y ensayamos la especificidad del antisero obtenido por slot-blot (Figura 12). El sistema inmune de los ratones fue sensible a los epítomos de la cápsida del MVM, ya que los sueros obtenidos reconocieron eficientemente el wt y las cápsidas del MVM-A7R. Es importante destacar que las cápsidas vacías de MVM-A7R indujeron anticuerpos anti-VEGF específicos que reaccionaron con el VEGF nativo inmovilizado en filtros (Figura 12). Este resultado apoya el reemplazo de residuos del eje 3X con VEbp como una exitosa estrategia para desarrollar una respuesta inmune α -VEGF con cápsidas de MVM quiméricas. Sin embargo, y de forma inesperada, inyecciones repetidas de cantidades equivalentes de viriones quiméricos infecciosos de MVM-A7R no indujeron niveles significativos de anticuerpos anti-VEGF (datos no mostrados).

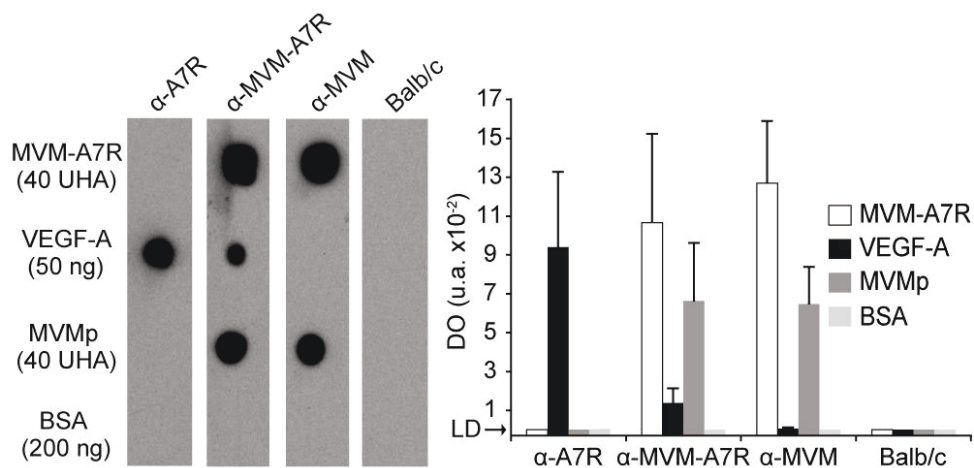


Figura 12. Inmunogenicidad de los VEbp presentados en cápsidas quiméricas. La figura muestra los títulos anti-VEGF medidos por slot-blot de los antisueros obtenidos al inmunizar ratones BALB/c con cápsidas quiméricas MVM-A7R. A la izquierda se muestran resultados representativos obtenidos por quimioluminiscencia con la dilución 1:200 de los anticuerpos, aplicando en filtros de nitrocelulosa con PBS las cantidades indicadas para cada una de las muestras. A la derecha se indican los títulos de los anticuerpos. Los valores son las medias con desviaciones estándar de cuatro inmunizaciones independientes (n=3 ratones por muestra). DO, densidad óptica; UHA, unidades de hemaglutinación; LD, límite de detección; u.a., unidades arbitrarias de densitometría.

2.4. Estabilidad genética del péptido A7R en el virus MVM quimérico.

La capacidad de MVM-A7R crecido extensamente en cultivo para evadir el reconocimiento por el anticuerpo α -A7R (Figura 10 y Figura 11), unidas a la incapacidad de los viriones MVM-A7R para inducir anticuerpos anti-VEGF en ratones, nos llevó a evaluar la estabilidad genética del péptido A7R y de las regiones vecinas en la cápsida quimérica. La secuencia de nucleótidos del bucle 4, el cual alberga los residuos reemplazados por los VEbp, así como de los otros tres bucles (del 1 al 3) de las VPs que forman la espícula (Figura 13A y B) fueron determinadas en poblaciones de wt y de virus quiméricos tras dos semanas de crecimiento en cultivo, tanto en clones biológicos moleculares como en clones infecciosos (PFU). Las secuencias de los bucles 1 al 3 obtenidas en poblaciones y placas aisladas no mostraron cambios de nucleótido respecto a la secuencia de referencia, tanto en los virus wt como en las quimeras, lo que indicó que la manipulación del bucle 4 por VEbp no selecciona ninguna modificación genética en los bucles restantes que conforman la espícula. Asimismo, la secuencia del bucle 4 en la población del MVM-P6L, y en múltiples clones biológicos (PFU) analizados de esta quimera, permanecieron idénticos al clon genómico original, sin mostrar evidencias de heterogeneidad (Figura 13C). Sin embargo, las secuencias del bucle 4 en muestras de poblaciones de la quimera MVM-A7R reflejaron una heterogeneidad genética en la posición del nucleótido 4016 en los cromatogramas.

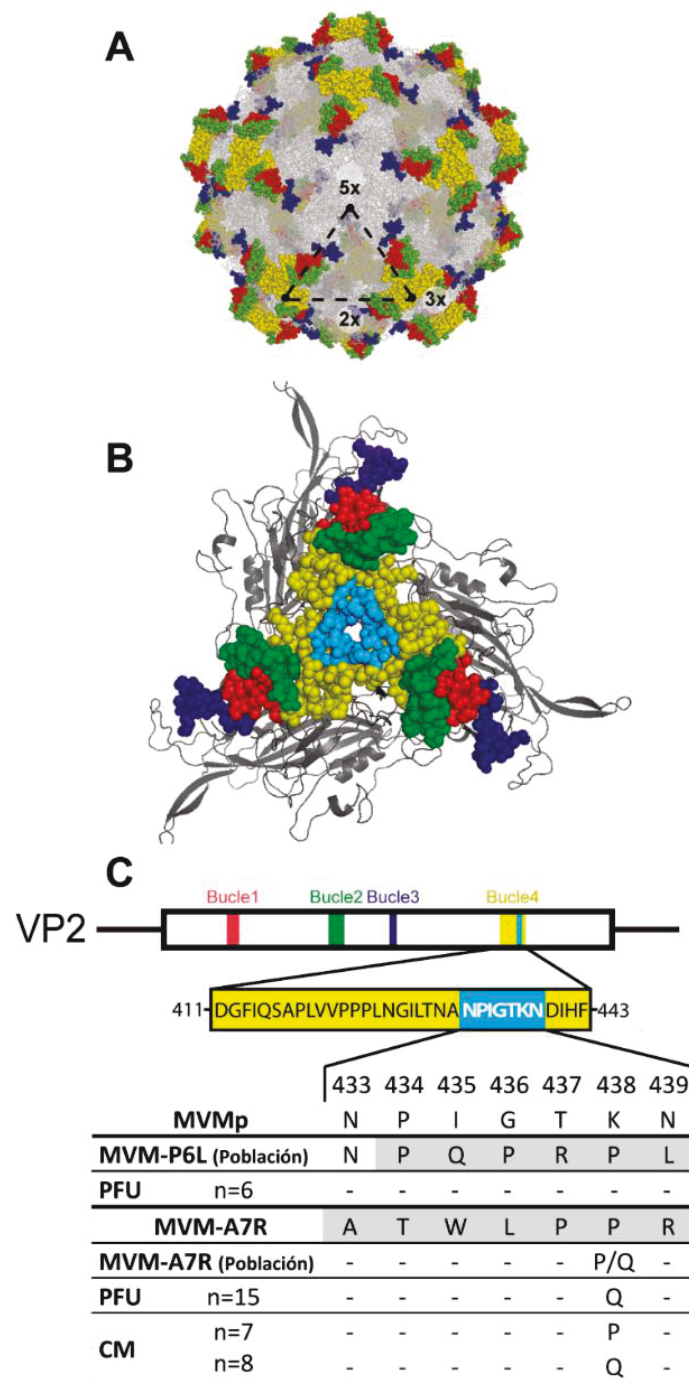


Figura 13. Estabilidad genética de las quimeras MVM-VEbp. (A) Estructura icosaédrica de la cápsida del MVMp (PyMol; número de acceso del PDB: 1z14) en una representación en barras (gris). La espícula se muestra como esferas coloreadas en el bucle 1 (rojo), bucle 2 (verde), bucle 3 (azul oscuro) y bucle 4 (amarillo). Se resaltan las localizaciones de los ejes de simetría 5X, 3X y 2X. (B) Vista superior ampliada de la topología de los bucles que conforman la espícula del MVM. Los residuos sustituidos que se encuentran en el bucle cuatro se han marcado en azul. (C) Análisis genético de los virus quiméricos crecidos en cultivo. Se estudiaron las secuencias nucleotídicas de los cuatro bucles de los virus quiméricos crecidos en cultivos. Se muestra la secuencia aminoacídica de VP2 que conforma el bucle 4 y se resaltan los residuos reemplazados por VEbp. Las secuencias promedio de las poblaciones de MVM-P6L y de MVM-A7R fueron obtenidas tras dos semanas en cultivo. PFU indica los clones biológicos del virus y CM los clones moleculares.

Resultados

Esta heterogeneidad se correspondió con la aparición de una mutación que cambia una citosina por una adenosina (Figura 13C), localizada en la segunda prolina del péptido A7R, que cambia a glutamina. Esta única mutación (P6Q) se observó en clones moleculares obtenidos a partir de una población de MVM-A7R: siete clones mantuvieron la adenosina, pero ocho mostraron la citosina en dicha posición, apoyando la heterogeneidad observada en la población (Figura 13C).

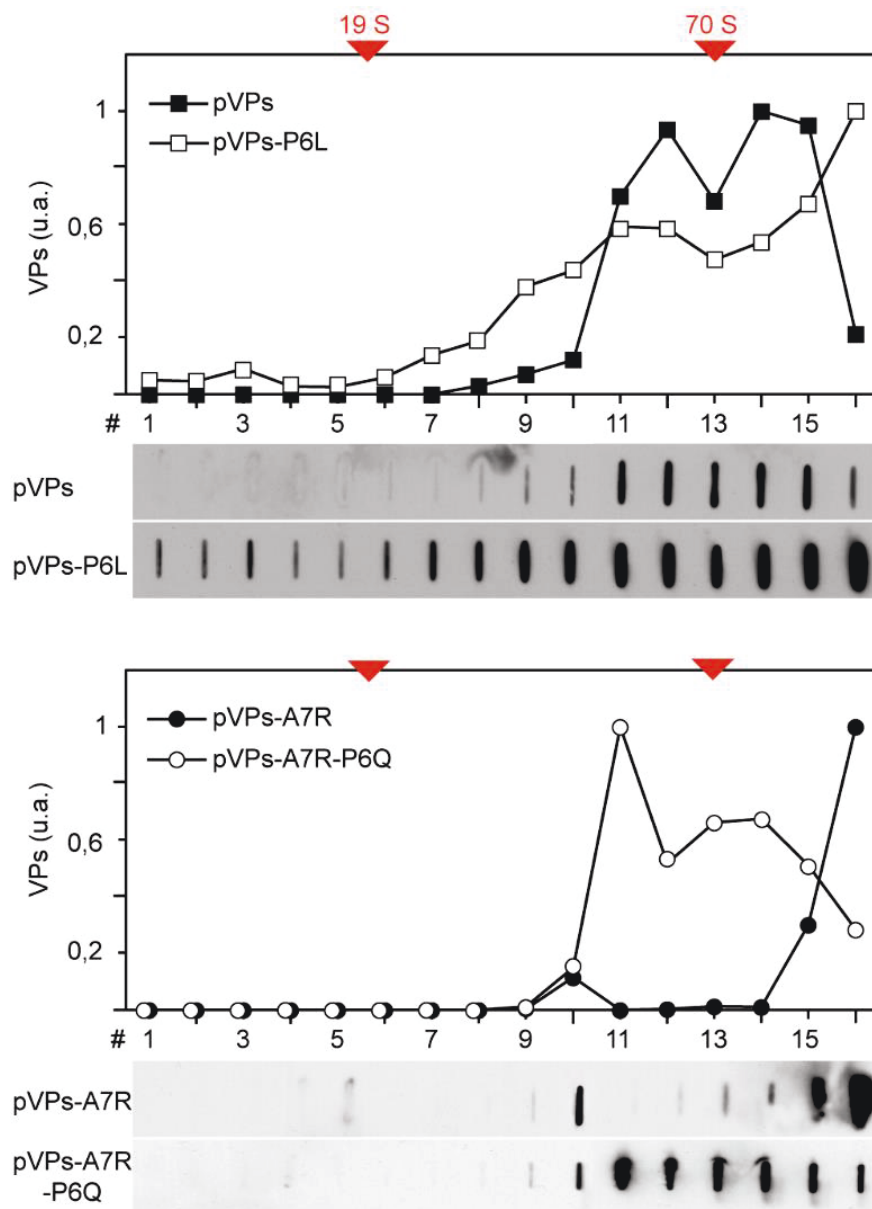


Figura 14. Patrón de ensamblaje de las cápsidas vacías quiméricas. Análisis por sedimentación del ensamblaje de las proteínas VPs expresadas por los plásmidos indicados en células NB324K tras 48 horas post-transfección. Las muestras fueron resueltas por centrifugación paralela a 4 °C y a través de un gradiente de sacarosa del 5%-30%, y las VPs de las fracciones fueron analizadas por slot-blot tal y como se muestra en la leyenda de la Fig 10. En la figura se muestran los patrones de ensamblaje de las proteínas estructurales del wt, de las quimeras P6L, A7R y del mutante A7R-P6Q. Los marcadores con los valores S de sedimentación (19S, tiroglobulina; 70S, cápsidas de MVM vacías) se indican en la parte superior. u.a. indica las unidades arbitrarias de densitometría.

Es de destacar que los análisis genéticos realizados con clones biológicos (PFU) aislados de poblaciones de MVM-A7R mostraron el cambio P6Q en todos los casos (Figura 13C). Por lo tanto, el péptido A7R insertado en el bucle 4 de la espícula daña la capacidad de formación de placas de lisis del MVM, pero el cambio de un aminoácido P6Q seleccionado en cultivo devuelve la capacidad de plaqueo y de progresión de la quimera MVM-A7R-P6Q en cultivo.

Finalmente, estudiamos si la capacidad restaurada de formación de placas del mutante MVM-A7R-P6Q era debida al rescate de las funciones de ensamblaje de la cápsida. Para ello, comparamos los perfiles de velocidad de sedimentación de las proteínas VPs en gradientes de sacarosa obtenidas de transfecciones con los plásmidos respectivos del wt y de las quimeras MVM-A7R y A7R-P6Q (Figura 14). El wt y las proteínas quiméricas VP-P6L se auto-ensamblaron eficientemente en cápsidas con valores normales de sedimentación (Figura 14, arriba). Sin embargo, aunque las proteínas quiméricas VP-A7R formaron algunas cápsidas de tamaño normal, la mayoría se acumulaban en agregados de ensamblaje con valores S muy elevados en el fondo de los gradientes de sedimentación (Figura 14, abajo). Este patrón fue consistente con lo observado tras la transfección de los clones genómicos (Figura 13), lo que apoya el concepto de que el defecto en el ensamblaje de la quimera MVM-A7R es inherente a sus subunidades VP. El patrón de ensamblaje de las subunidades VP-A7R-P6Q fue similar al del wt, confirmando que P6Q es una mutación compensatoria que proporciona una solución estructural al defecto en el ensamblaje de la cápsida MVM-A7R.

3. Tolerancia funcional de la cápsida del MVMP a VEbp que sustituyen residuos de la espícula y del hoyuelo.

3.1. Efectos fenotípicos de los VEbp insertados en tres dominios funcionales de la cápsida.

La sustitución de secuencias wt por péptidos heterólogos de tamaño similar ha sido recientemente probada como una mejor aproximación que la simple inserción para modificar la cápsida del MVM (Grueso et al. 2019). En el presente estudio hemos usado esta estrategia para intentar redireccionar la infección del MVM hacia células que expresan el VEGFR-1. Para una mayor simplicidad en la nomenclatura de los viriones quiméricos obtenidos, los tres dominios funcionales de la cápsida (Figura 15A) y los tres péptidos insertados que bloquean VEGF (VEbp; Figura 15B) han sido nombrados con letras. El conjunto de clones genéticos moleculares obtenidos, que contienen una sola (ej. Ad) o dos (ej. NdPs) sustituciones de la secuencia peptídica del wt, fueron transfectados individualmente en células NB324K y analizados para las etapas principales del ciclo vital del virus: expresión de las proteínas estructurales de la cápsida (VPs), translocación nuclear de estas VPs, ensamblaje de la cápsida,

Resultados

replicación y encapsidación del genoma viral, rendimiento de virus, y capacidad de propagación de la infección a células vecinas. Estos análisis han sido efectuados en nuestro laboratorio a lo largo de varios años por distintos investigadores, y los resultados más representativos se resumen en la Tabla III. Como puede observarse en esta Tabla, las proteínas de la cápsida (VPs) y los intermediarios replicativos del ADN viral se acumularon en todas las transfecciones ensayadas con las quimeras moleculares. Las VPs se translocaron al núcleo eficientemente y configuraron en su interior epítomos de la cápsida, aunque como era esperable el epítipo principal conformacional de la espícula (B7-mAb) se perdió en aquellas quimeras que portaban VEbp insertados en el bucle 4 (Figura 10 y Figura 11; Tabla III).

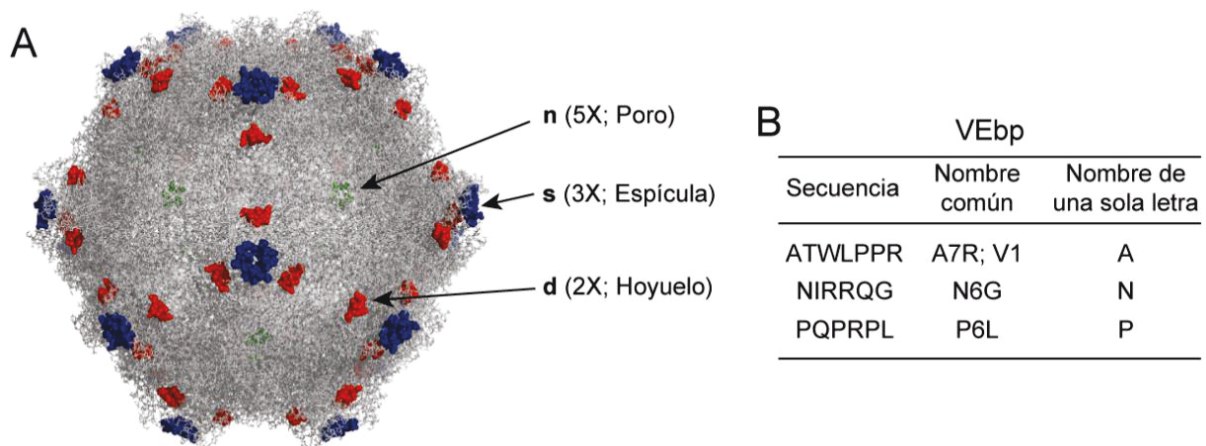


Figura 15. Ilustración de la inserción o sustitución de residuos en tres dominios de la cápsida del MVM por péptidos que bloquean VEGF. (A) Estructura de la cápsida del virus MVMp (número de acceso del PDB: 1z14) en la que se resaltan los dominios manipulados en el hoyuelo (2X), espícula (3X), y el dominio N-terminal de VP2 en el poro (5X). (B) Secuencia de los péptidos que bloquean VEGF que se han empleado en las construcciones. Se indican los nombres más comunes que reciben en la literatura y a la derecha el código de una sola letra usado en este estudio.

Los efectos fenotípicos más importantes observados fueron tres (Tabla III): (i) las quimeras que llevaban cualquiera de las VEbp insertadas en la VP2-Nt, aunque tuviesen sustituidos los residuos del hoyuelo, produjeron cantidades notables de cápsidas ensambladas, pero no así las quimeras manipuladas en la espícula, que solo toleraron el péptido P; (ii) once quimeras que conseguían ensamblar cápsidas permitieron también el empaquetamiento del genoma viral, lo que fue demostrado mediante métodos diversos; (iii) de estas once quimeras que formaron viriones quiméricos, ocho carecían de la capacidad para propagarse con carácter infeccioso en cultivo o para iniciar la infección. El fallo en la infectividad de los viriones que pertenecen a la serie An puede explicarse por una externalización fallida del dominio VP2-Nt (Sánchez-Martínez et al. 2012), mientras que los viriones quiméricos no infecciosos que tienen el hoyuelo modificado pueden llevar defectos en la unión o en la entrada en células que expresan VEGFR-1. En suma, los únicos viriones MVM quiméricos que cumplieron los criterios de infección, y

que por tanto se estudiaron más en profundidad fueron el Nd (que lleva el péptido N en el hoyuelo), el Ps (que lleva el péptido P en la espícula) y la doble quimera NdPs.

Tabla III. Fenotipo de los viriones quiméricos VEbp-MVMp

	Mono-Dominio									Bi-Dominio							
	Wt	Δd	Ad	Nd	Pd	As ⁽²⁾	Ns	Ps ⁽²⁾	An ⁽¹⁾	Ad Ps	Nd Ps	Pd As	Pd Ns	Pd Ps	An Ad	An Nd	An Pd
^a Epítomos de la cápsida	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
^b Epítipo 3X	+	-	+	+	+	-	-	-	+	-	-	-	-	-	+	+	+
^c Producción de proteínas de la cápsida	+	-	nd	+	+	+/-	+	+	+	nd	+	nd	nd	nd	nd	+	nd
^d Replicación del genoma	+	+	+	+	+	+	+	+	nd	nd	+	+	nd	+	nd	nd	nd
^e Producción de virus completo	+	-	+	+	+	+/-	-	+	+	nd	+	-	-	+	+	+	+
^f Progresión en cultivo	+	-	-	+	-	+/-	-	+	-	-	+	-	-	-	-	-	-

(a) Tinción IF con el anticuerpo policlonal α -MVM en células transfectadas. (b) Tinción IF con el anticuerpo mAb tras 2 dpt. (c) Detección de proteínas de la cápsida en gradientes de CICs por slot blot. (d) Detección del intermediario replicativo RF-I por southern blot. (e) Tinción con el anticuerpo anti-2Nt, resolución del ADN monocatenario en southern-blot, e hibridación en slot-blot de fracciones de gradientes de CICs para la purificación de virus. (f) Estimación del porcentaje de células NB324K que expresan VPs (IFU) tras 2-4 dpt. En color verde se marcan viriones infecciosos y en naranja los no infecciosos. nd, no determinado. Esta tabla recoge los resultados mostrados en las Figuras 8, 10 y 11, conjuntamente con los descritos en las publicaciones ⁽²⁾ Grueso et al. 2019; ⁽¹⁾ Sánchez-Martínez et al. 2012 y Calvo-López et al. (En preparación).

3.2. Impacto de la inserción de VEbp sustituyendo residuos del hoyuelo y de la espícula sobre la infectividad específica.

Las características de la infección y el tropismo de los tres viriones quiméricos VEbp-MVM que mostraron una capacidad de infección significativa fueron estudiados en más profundidad y comparados con el wtMVMp. Para ello, en primer lugar, se testaron viriones llenos de ADN altamente purificados en su capacidad de hemaglutinación y de infección. Para analizar la capacidad hemaglutinante, cantidades equivalentes de cápsidas normalizadas por UHA se resolvieron en geles de acrilamida y que se tiñeron directamente con controles internos para determinar el contenido de proteína (Figura 16A), o se revelaron con anticuerpos mediante Western-Blot (Figura 16B). Este análisis demostró que la

Resultados

capacidad de hemaglutinación específica de los viriones quiméricos es varias veces menor que la de wt (Figura 16C), lo que sugiere que tanto el hoyuelo como la espícula pueden estar involucrados en la unión a eritrocitos durante la formación de la red que sedimenta en el ensayo.

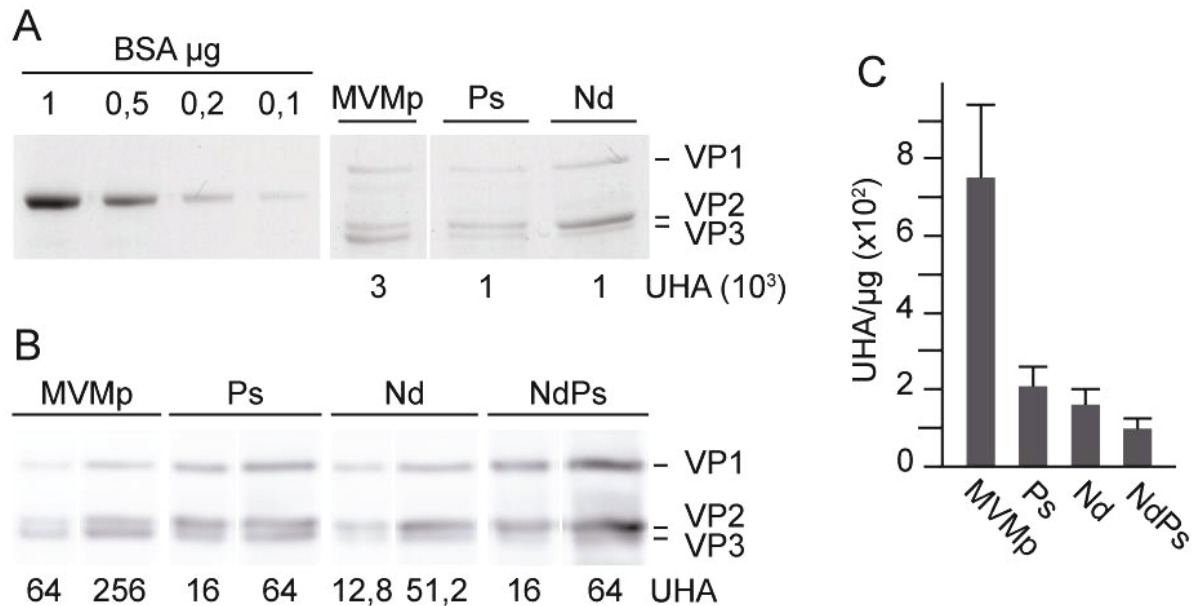


Figura 16. Capacidad hemaglutinante de los viriones quiméricos MVM-VEbp. (A) Análisis cuantitativo de la masa de proteínas VPs de viriones quiméricos VERb-MVM y wt purificados en gradientes de CICs y teñidos con coomassie en un gel SDS-PAGE. En la imagen se indican las unidades de UHAs cargadas para cada virus. Como control de masa de proteína se utilizó BSA. (B) Análisis de los mismos viriones mediante Western-blot utilizando el anticuerpo anti-VPs. En la imagen se indican las unidades de UHAs cargadas para cada virus. (C) Actividad de hemaglutinación relativa. Los valores fueron calculados a partir de al menos dos preparaciones independientes de viriones purificados.

Para estudiar la infectividad de los viriones se analizaron dos propiedades. En primer lugar, inspeccionamos la morfología de las placas de lisis con dos métodos: una tinción convencional con cristal violeta, y otra con el anticuerpo anti-VPs de monocapas transferidas a filtros. Como se observa en la Figura 17A, aunque el carácter lítico es similar, el tamaño medio de las placas de lisis de los viriones Nd es ligeramente menor que la del wt, y sensiblemente menor para el Ps. De forma llamativa, la quimera doble NdPs forma placas de lisis diminutas, que son únicamente detectables por tinción con anticuerpo anti-VPs. Estos fenotipos de morfología de placa reflejan restricciones en la capacidad de las quimeras de expandirse a células vecinas, que pueden estar determinadas por mecanismos diversos tales como defectos en el ensamblaje de la cápsida o en el reconocimiento de receptores (ver más abajo).

A continuación, determinamos la infectividad específica de las quimeras. Para ello se llevó a cabo un ensayo de UFP empleando el método de tinción con el anticuerpo anti-VPs y aplicando cantidades de viriones normalizadas por la masa. Como se muestra en la Figura 17B, la infectividad específica de las quimeras sencillas (Ps y Nd) fue alrededor de 20 veces menor que la del wt, y dos unidades

logarítmicas menor para la quimera doble NdPs. Por lo tanto, la infectividad específica de las quimeras es sensiblemente menor que la del wt, y proporcional al tamaño característico de la placa de lisis en cada caso. Esto indica que muchos viriones quiméricos no forman placas de lisis detectables con el anticuerpo anti-VPs.

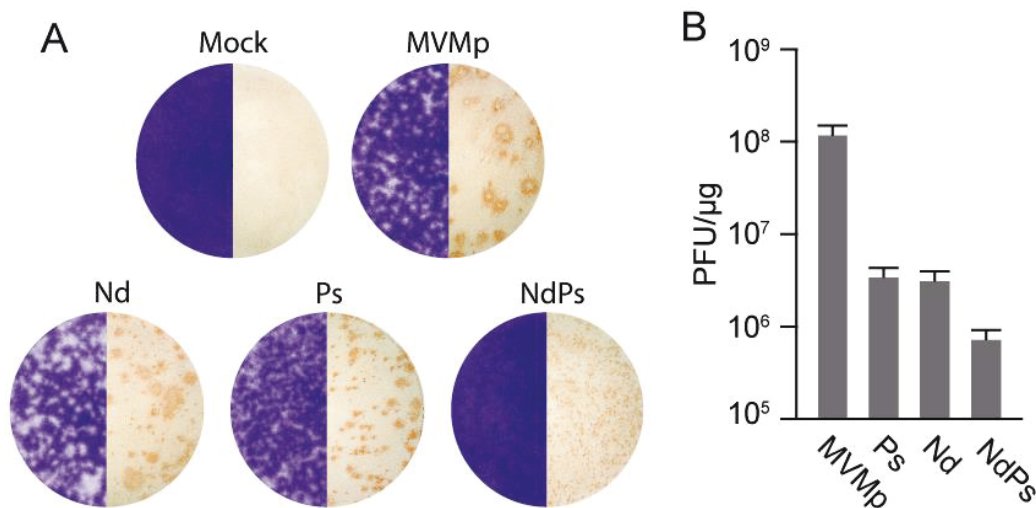


Figura 17. Morfología de placa e infectividad específica de los viriones quiméricos MVM-VEBP. (A) Morfología de placa. La figura ilustra el tamaño y la característica lítica de las placas formadas por el wtMVM y por los virus quiméricos en células NB324K. Para cada virión se ilustra a la izquierda una tinción con cristal violeta de monocapas fijadas (diluciones 10^{-4} de las quimeras Nd, Ps y NdPs y 10^{-6} del MVMp) y a la derecha la tinción de otra monocapa distinta con el anticuerpo α -VPs (diluciones 10^{-4} del NdPs, 10^{-5} de las quimeras Nd y Ps y 10^{-7} del MVMp). (B) Infectividad específica obtenida por el cociente entre el número de PFUs (reveladas por tinción con el anticuerpo α -VPs en monocapas de NB324K) y la masa de las partículas virales purificadas. Los valores son medias con errores estándar de al menos tres determinaciones independientes.

Finalmente, como una característica adicional de la infectividad, se determinó la capacidad de estos viriones para evadir la neutralización con el anticuerpo B7-mAb en un ensayo analizado por citometría (Figura 18). Como era previsible, se observó que este anticuerpo monoclonal neutraliza la infectividad (medido como células que expresan la proteína no estructural NS1) de la quimera Nd, pero no la de las quimeras Ps y NdPs (Figura 18), ya que ambas poseen sustituciones con VEbp precisamente en el epítipo que une este anticuerpo monoclonal (Kaufmann et al. 2007).

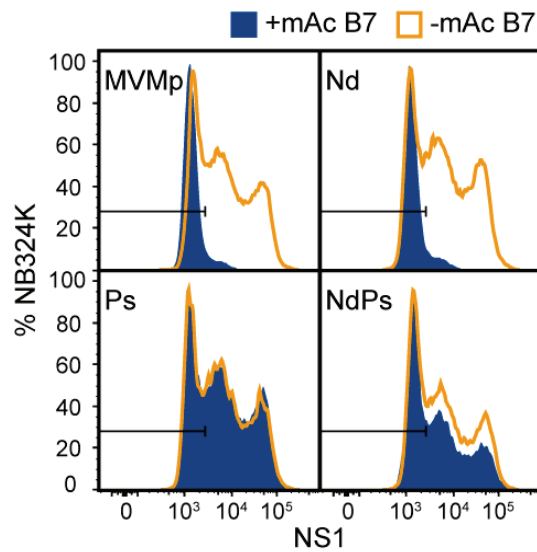


Figura 18. Evasión de neutralización de viriones quiméricos MVM-VEbp. Análisis por citometría de la expresión de la proteína NS1 en cultivos inoculados con cantidades normalizadas de virus infecciosos (MOI 10, PFU revelando por tinción con el anticuerpo anti-VPs), tanto en PBS (-mAb B7) como incubados con el anticuerpo monoclonal neutralizante (+mAb B7). Los extractos celulares fueron recogidos tras 20 horas post-inoculación y analizados por citometría de flujo utilizando el anticuerpo α -NS1.

3.3. El péptido N insertado en el hoyuelo incrementa el tropismo del parvovirus MVMp hacia células de glioblastoma humano.

Los gliomas humanos expresan generalmente VEGFR-1 a niveles elevados (Plate et al. 1992), por lo que nos resultó interesante estudiar si las sustituciones con VEbp alteraban el tropismo natural del MVM hacia células de glioblastoma (Gil-Ranedo et al. 2021; Rubio et al. 2005). Para analizar esta posibilidad, se determinó la infectividad específica de las tres quimeras Nd, Ps y NdPs y del virus wt hacia la línea celular de glioblastoma humano U373 MG, en comparación con los fibroblastos humanos NB324K usados de referencia. Se inocularon en paralelo monocapas de ambos tipos celulares con cantidades graduales de UHA de los viriones purificados, y la permisividad a la infección se evaluó cuantitativamente a las 24 hpi por IF con el anticuerpo específico anti-NS1. Los resultados expresados como el porcentaje de células que expresan NS1 se muestran en la Figura 19A, y la Figura 19B ilustra un ejemplo representativo de este tipo de experimento. De acuerdo a los datos mostrados en la Figura 17, en este ensayo de IF la infectividad específica del MVMwt en los dos tipos celulares fue sustancialmente superior a la de las quimeras. Pero si se considera la infectividad específica en la relación NB324K/U373 MG, esta fue similar para el wtMVM y la quimera Ps, con una clara preferencia de infección (próxima a 20 veces superior) hacia las células NB324K. Por el contrario, las quimeras Nd y NdPs mostraron una capacidad de infección de células U373 MG muy superior a los anteriores, ya que la relación de células infectadas NB324K/U373 MG se redujo a un valor próximo a 5 veces. Estos

experimentos demostraron que los virus quiméricos con sustitución del péptido N en el hoyuelo (Nd y NdPs), pero no el que porta la sustitución Ps en la espícula, poseen un tropismo incrementado hacia células de glioblastoma humano con respecto al wtMVM.

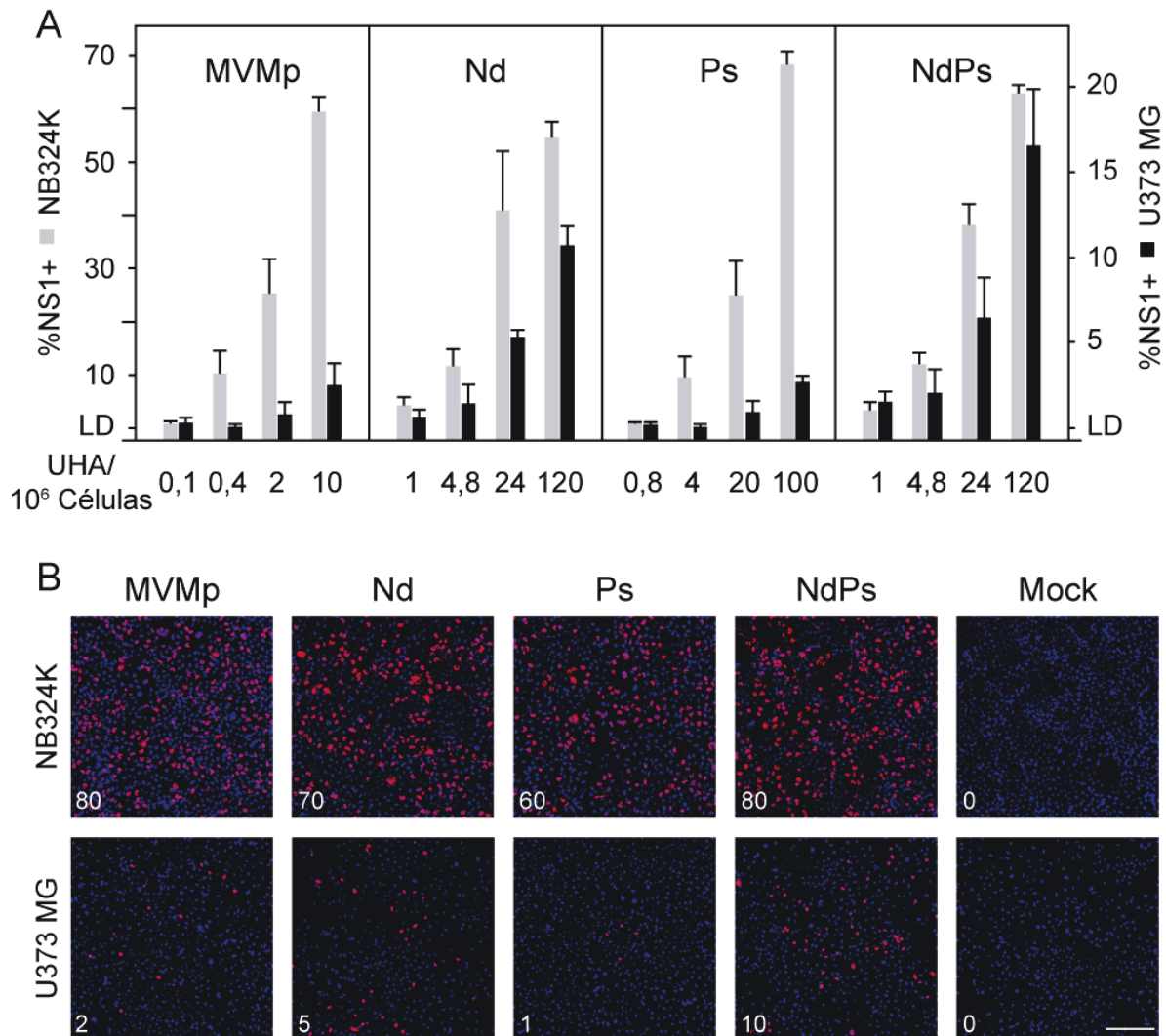


Figura 19. Efecto del péptido N insertado en el hoyuelo sobre el tropismo del MVM hacia células de glioblastoma humano. (A) Infectividad relativa del wtMVMp y de los viriones quiméricos Nd, Ps y NdPs en células humanas NB324K (barras en gris) y U373 MG (barras en negro). Las monocapas fueron inoculadas con las cantidades indicadas de viriones purificados cuantificados como unidades de hemaglutinación (UHA). Los datos ilustran el porcentaje de células que expresan NS1 determinadas por IF-confocal. Los valores corresponden a la media con los errores estándar de dos experimentos independientes, y se obtuvieron contando visualmente células de al menos tres campos por experimento ($n \geq 10^3$). (B) Ejemplo ilustrativo de este tipo de experimento en el que se observa un porcentaje relativamente mayor de células NS1+ de U373 MG con respecto a NB324K tras la inoculación con los viriones de Nd y NdPs. La barra de escala de las imágenes corresponde a 50 μ m. Las cifras en los paneles corresponden a los porcentajes aproximados de células NS1+ en los campos mostrados.

4. Análisis del uso de receptores por los virus quiméricos MVM-VEbp

4.1. La infección de los virus quiméricos VEbp-MVM no está relacionada con la unión a VEGFR-1.

Seguidamente estudiamos si el tropismo aumentado de Nd hacia las células de glioblastoma estaba determinado por el uso de VEGFR-1 como receptor, ya que el péptido N insertado en el hoyuelo tiene capacidad en solución de unir esta molécula (Giordano et al. 2001). Para ello, analizamos en primer lugar la expresión del VEGFR-1 en células susceptibles a la infección por MVMp. Como se muestra en la Figura 20A, se detectaron niveles de acumulación de VEGFR-1 elevados en fibroblastos humanos transformados NB324K, pero muy inferiores o casi indetectables en la línea celular A9 de fibroblastos de ratón. Sin embargo, y a pesar del fenotipo prácticamente nulo para VEGFR-1, los fibroblastos de ratón A9 fueron susceptibles a la infección por Nd (medida por expresión de NS1) a niveles comparables a los de la línea NB324K altamente permisiva (Figura 20B). Este experimento sugería fuertemente que, como el wt, la quimera Nd no usa VEGFR-1 para infectar.

Para profundizar en este fenómeno, estudiamos a continuación la posibilidad de una unión no productiva Nd/VEGFR-1, usando VEGFR-1 soluble (sVER1) como competidor. En las condiciones del experimento (Figura 20C), el wtMVM y los viriones quiméricos purificados se unieron cuantitativamente a células NB324K y U373 MG (ver carriles unido “u” respecto al *input* “I”). En un ensayo de unión en donde se utilizó un exceso de hasta 5 veces más de moléculas de sVER1 con respecto a viriones de MVMp y Nd (ver Materiales y Métodos), no se observó una disminución significativa de la cantidad de viriones de wtMVM ni de Nd unidos a ambos tipos celulares (Figura 20C; carriles u). En experimentos controles se pudo demostrar la capacidad efectiva de unión del sVER1 a VEGF en solución (Figura 20E), la estabilidad del sVER1 durante los ensayos con virus, así como una leve capacidad de unión a la superficie celular (Figura 20F). Concluimos por tanto que el virión Nd no usa VEGFR-1 para unirse a las células.

Para analizar esta importante conclusión en otro tipo de ensayo, se estudió en condiciones similares el efecto de un exceso de sVER1 sobre la infección (determinada por la expresión de NS1 en blot). Como puede observarse en la Figura 20D, de acuerdo al análisis de unión, un exceso de 5 veces de sVER1 no previene la infección de células NB324K por el wt ni por el Nd. Finalmente, puesto que el ácido siálico interviene en la infección del wt y del Nd (ver más adelante), nos pareció importante demostrar que un pre-tratamiento de sVER1 con dosis de neuraminidasa que eliminan restos de siálico de glicoproteínas, tampoco impide la infección de células NB324K por el virión Nd (Figura 20D, derecha), confirmando la falta de función de sVER1 en este proceso.

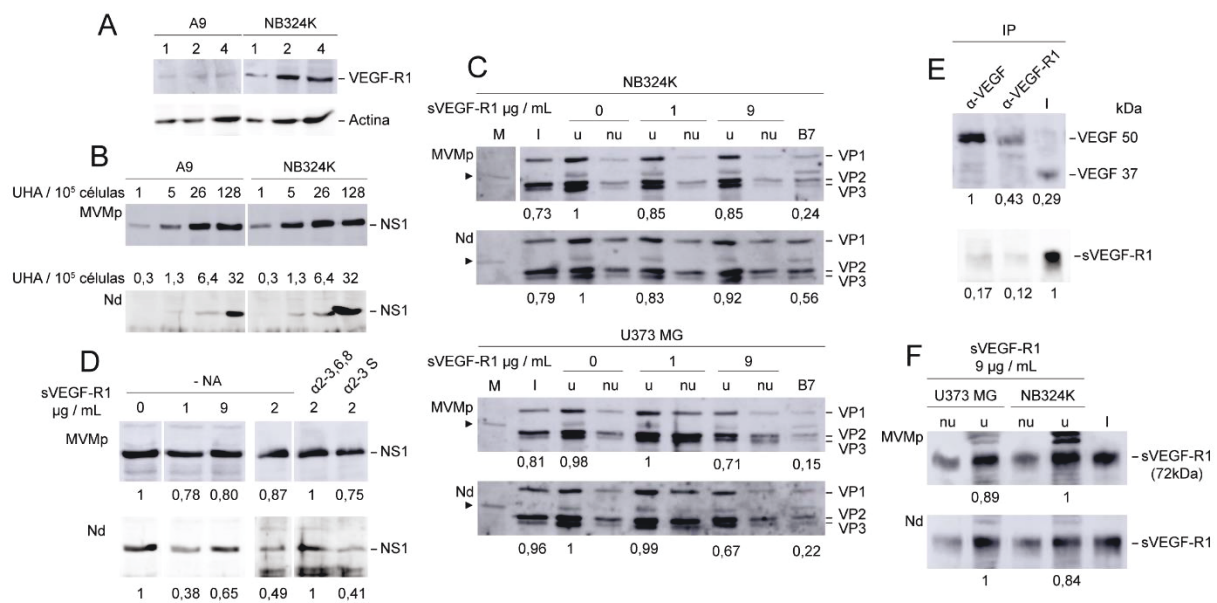


Figura 20. Análisis del uso de VEGFR-1 para la unión e infección del MVMp y del virus quimérico Nd. (A) Expresión de VEGFR-1 en líneas celulares analizado por western-blot utilizando el anticuerpo policlonal α -VEGFR-1 (1/200). Las cifras indican volúmenes relativos aplicados de los extractos de células. Actina es el control de carga. (B) Capacidad relativa de infección de células A9 y NB324K por wtMVMp y por la quimera Nd analizada por la expresión de NS1 en western-blot. (C) Análisis de unión del MVMp y del virión quimérico Nd a células NB324K y U373 MG en presencia y ausencia de las cantidades indicadas de sVEGFR-1. Las inoculaciones fueron realizadas con cantidades normalizadas de partículas de viriones purificados. Se muestra la detección de las proteínas virales estructurales (VP1, VP2 y VP3) por western-blot. La imagen ilustra las proteínas unidas (u) y no unidas (nu). La cabeza de flecha señala una proteína VP no identificada, presente en las células no infectadas, que podría proceder de cápsidas del parvovirus BPV acumuladas en ciertos lotes de suero. (D) Expresión de NS1 analizada por western-blot a las 20 hpi en células NB324K infectadas con wt y Nd en presencia de las cantidades indicadas de sVEGFR-1. Derecha: ensayo similar pero efectuado tras la incubación de sVEGFR-1 con las neuraminidasas $\alpha 2-3$ S y $\alpha 2-3,6,8$. (E) Análisis de la unión del VEGF a sVEGFR-1. El factor y su receptor soluble fueron incubados a una concentración de 5 ng/ml, seguido de una IP con *sepharosa* y un western-blot con anticuerpos específicos. (F) Detección de sVEGFR-1 por western-blot en las muestras u y nu del ensayo de unión del apartado C realizado con altas dosis (9 μ g) de sVEGFR-1. u.a., unidades arbitrarias relativas de densitometría para cada blot.

4.2. Los viriones wtMVM y Nd difieren en el uso de ácidos siálicos para la unión e infección de células transformadas humanas.

El parvovirus MVM utiliza macromoléculas con ácido siálico (sia) como receptor primario para infectar, y los residuos que contactan con sia se localizan en el hoyuelo (eje 2X) de la cápsida (López-Bueno et al. 2006). Por lo tanto, consideramos de interés estudiar si el sia actúa de mediador en el reconocimiento celular por el virión quimérico Nd, que es infeccioso y porta la sustitución de residuos por VEbp en el hoyuelo. Realizamos un análisis cuidadoso de la interacción de Nd con sia en los dos tipos de células transformadas humanas (NB324K y U373MG) para las que habíamos determinado su capacidad de infección, incluyendo la adsorción, entrada y expresión génica.

Resultados

Comenzamos estudiando el impacto de la eliminación de restos de sia de la superficie celular en la infección de wtMVM y de Nd utilizando cantidades graduales de dos tipos de neuraminidasas. En la Figura 21A se observa el efecto en la unión de la incubación de células NB324K con la Neuraminidasa (acetil-neuraminil hidrolasa o sialidasa) α 2-3 Neuraminidasa S (NA α 2,3 S), una exoglucosidasa altamente específica que cataliza la hidrólisis de los residuos N-acetilneuramínico (o ácido siálico) unidos por enlaces α 2-3 a otros oligosacáridos presentes en glicoproteínas y glicolípidos. Si bien a bajas dosis de enzima (hasta 12 U/ μ l) no se aprecian efectos significativos (Figura 21A, izquierda), la eliminación de restos de sia a dosis más elevadas de 13 y 26 U/ μ l redujo drásticamente la capacidad de unión de los viriones wtMVM en forma dosis dependiente (Figura 21A, derecha). La unión de los viriones Nd a células NB324K también fue suprimida gradualmente por esta enzima en experimentos realizados en paralelo, pero con una diferencia en la respuesta clara, ya que a la dosis de 12 U/ μ l no hay efecto (Figura 21A, izquierda) y la unión disminuyó menos de la mitad a la dosis 13 U/ μ l en otro experimento (Figura 21A, derecha).

A continuación, estudiamos el efecto de la eliminación de sia por la Neuraminidasa α -2,3S en la infección de los virus wt y Nd (Figura 21C). La eliminación de sia con enlace alpha 2-3 de la superficie de células NB324K determinó una disminución progresiva en la capacidad de infección del wtMVM (cuantificada por los niveles de expresión de la proteína NS1). La caída de infección es más apreciable a las dosis altas que impiden la adsorción del virus. Sin embargo, el Nd se comportó de forma muy distinta en estos experimentos, ya que las dos dosis más bajas de NA ensayadas (6 y 13 U/ μ l) produjeron un incremento progresivo en los niveles de infección, hasta alcanzar dos veces el valor de infección sin NA. A dosis elevadas de NA el nivel de infección del virus Nd disminuye de forma paralela a como lo hace al wt.

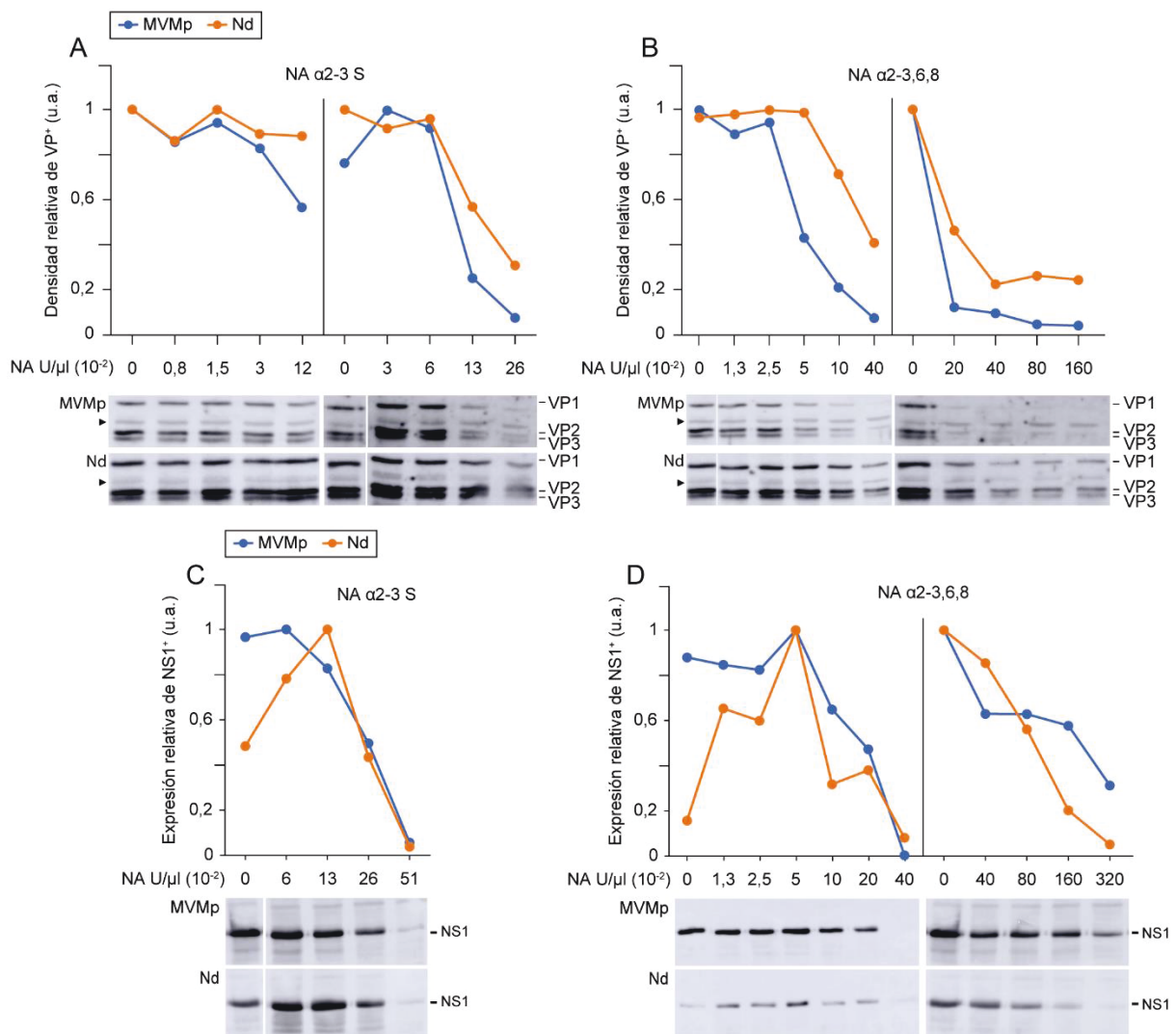


Figura 21. Papel del ácido siálico en la unión e infección de wt y Nd en fibroblastos NB324K. (A) Ensayos de unión en presencia de la neuraminidasa α 2-3S. Las proteínas estructurales virales unidas (VP1, VP2 y VP3) se detectaron y cuantificaron mediante western-blot (abajo). La cabeza de flecha indica la proteína VP presente en suero posiblemente producto de BPV. (B) Ensayos de unión en presencia de la neuraminidasa α 2-3,6,8 llevados a cabo en A. (C) Infección de wtMVMp (azul) y Nd (naranja) inoculados como $8,5 \cdot 10^{12}$ viriones purificados por 10^5 células en presencia de las cantidades indicadas de la NA α 2-3S. La infección se cuantificó por el nivel de expresión de la proteína viral NS1 en western-blot realizados 20 hpi (abajo). (D) Capacidad de infección en presencia de las cantidades indicadas de la neuraminidasa α 2-3,6,8. Las condiciones del ensayo son como en C. u.a. unidades relativas arbitrarias de densitometría. En toda la figura se muestra la densidad relativa de cada banda de un experimento representativo hecho en paralelo para todas las condiciones de una misma gráfica, que en dosis menores fue único, y en dosis elevadas procede de al menos dos ensayos independientes por cada condición.

En los tratamientos de células NB324K con la Neuraminidasa α 2-3,6,8 (2-3,6,8NA), que cataliza la hidrólisis de los enlaces α 2-3, α 2-6 y α 2-8 de residuos sia, se observó que esta NA también previene de forma progresiva la unión de viriones wt desde las dosis de 5 U/ μ l hasta alcanzar niveles indetectables a dosis elevadas (Figura 21B). En clara diferencia, la unión del virión Nd a células NB324K se ve afectada solo a partir de la dosis 10 U/ μ l, la caída es menor que la del wt en todo el rango de dosis ensayadas, y prevalece una cierta proporción de viriones unidos incluso a las dosis más elevadas.

Resultados

En el análisis de los efectos del tratamiento con la NA α 2-3,6,8 a dosis elevadas sobre la infección (Figura 21D, derecha), también se observó una caída progresiva dosis dependiente de la infección del wtMVM y Nd (medida por los niveles de expresión de la proteína NS1 en western-blot). Estos efectos progresivos sobre la infección a altas dosis de neuraminidasa fueron apoyados por citometría de flujo en análisis cuantitativos efectuados con una serie de muestras infectadas en paralelo (Figura 22). Sin embargo, un análisis cuidadoso realizado con dosis bajas de esta NA mostró un incremento progresivo y drástico en la capacidad de infección del Nd en el rango de dosis 0-5 U/ μ l, hasta alcanzar un valor de diez veces mayor que en ausencia de NA (Figura 21D, izquierda), un rango de dosis en el que paradójicamente los niveles de adsorción del virus no se ven alterados (Figura 21B, derecha). Este beneficio en la infección no se aprecia para el wtMVM a ninguna de las dosis ensayadas, ya que tanto la expresión de NS1 como el porcentaje de células que expresan esta proteína decaen proporcionalmente con la dosis de NA (Figura 21D y Figura 22).

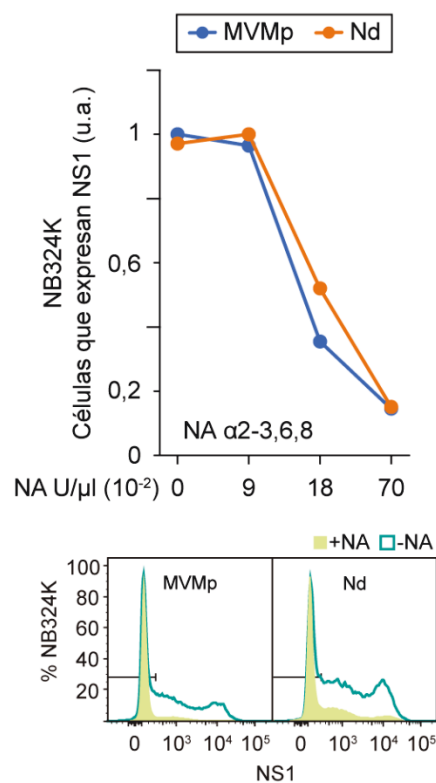


Figura 22. Análisis citométrico del uso de ácidos siálicos por los virus wt y Nd en la infección de células NB324K. Análisis por citometría de flujo de la expresión de la proteína NS1 en células NB324K infectadas y tratadas con las dosis indicadas de NA α 2-3,6,8. Se muestra el porcentaje de células que expresan NS1 para cada una de las dosis de NA ensayadas tras 20 hpi. En la parte inferior se muestra un ejemplo de los resultados de citometría obtenidos en muestras tratadas con la dosis de $18 \cdot 10^{-2}$ U/ μ l de NA α 2-3,6,8.

Para extender el estudio a otro tipo celular con mayor relevancia oncológica, los ensayos de unión y de infección con los virus wt y Nd se realizaron, empleando condiciones similares, con la línea celular de glioblastoma humano U373MG. La unión de los viriones wtMVM y Nd a estas células no se vio

afectada tras la incubación con bajas dosis de NA α 2,3 S, pero disminuyó a altas dosis de forma más acusada para el virión wt (Figura 23A, izquierda). Tras los tratamientos de estas células con la NA α 2-3,6,8 se observó un ligero aumento de unión de ambos virus, seguido de una disminución progresiva a medida que se incrementaron las dosis de enzima, siempre de forma más acusada para el virus wt que para la quimera Nd (Figura 23B, derecha). Estos resultados fueron similares a los obtenidos en las células NB324K (Figura 22A, B) lo que sugiere que el wtMVM y la quimera Nd usan para unirse a las superficies celulares tipos de sia con alguna diferencia en su composición o estructura.

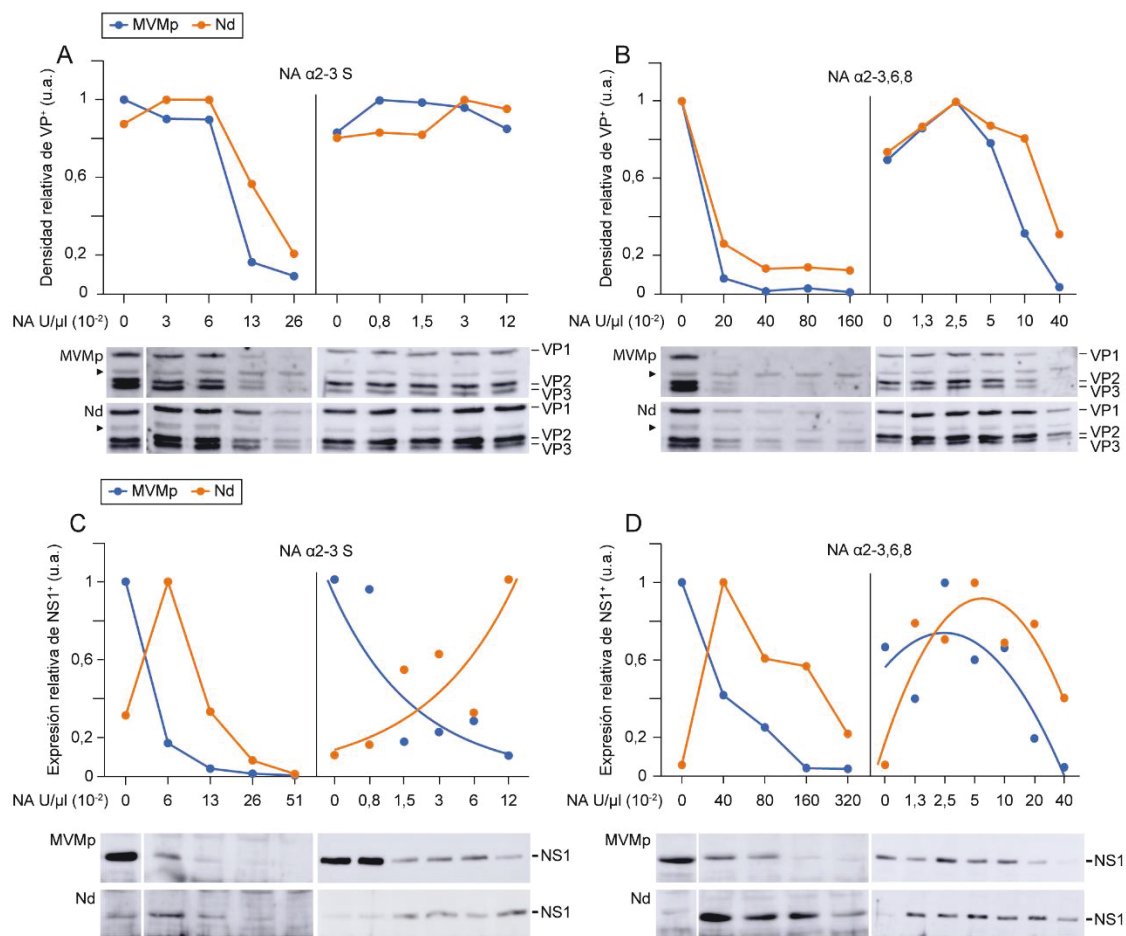


Figura 23. Papel del ácido siálico en la unión e infección de los virus wt y Nd en células U373MG. (A) Ensayos de unión a células U373MG en presencia de la neuraminidasa α 2-3S. Las proteínas estructurales virales unidas (VP1, VP2 y VP3) se detectaron y cuantificaron mediante western-blot (abajo). La cabeza de flecha indica la proteína VP presente en suero. (B) Ensayos de unión en presencia de la neuraminidasa α 2-3,6,8 llevados a cabo como en A. (C) Capacidad de infección en presencia de las cantidades indicadas de la neuraminidasa α 2-3S. Infección de wtMVMp (azul) y Nd (naranja) inoculados como $8,5 \cdot 10^{12}$ viriones purificados por 10^5 células en presencia de las cantidades indicadas de la NA α 2-3S. La infección se cuantificó por el nivel de expresión de la proteína viral NS1 en western-blot realizados 20 hpi (abajo). La gráfica de la derecha se ajusta a una curva exponencial. (D) Capacidad de infección en presencia de las cantidades indicadas de la neuraminidasa α 2-3,6,8 llevado a cabo como en C. La gráfica de la derecha se ajusta a una curva polinómica de grado 2. En toda la figura se muestra la densidad relativa de cada banda de un experimento representativo hecho en paralelo para todas las condiciones de una misma gráfica, que en dosis menores fue único, y en dosis elevadas procede de al menos dos ensayos independientes por cada condición. u.a. unidades relativas arbitrarias de densitometría.

En los análisis de la relación entre sia y la infección de células U373MG, se observó una caída drástica en la infección del wtMVM hasta niveles de fondo a medida que los residuos alpha 2-3 de sia fueron eliminados por dosis crecientes de 2-3NA (Figura 23C). La infección con Nd también disminuyó a altas dosis, aunque en un grado menor, pero se observó un aumento muy sorprendente en la capacidad de infección a la dosis de 6 U/ μ l (Figura 23C, izquierda). Un análisis más detallado desarrollado en el rango de dosis bajas 0-12 U/ μ l demostró un aumento progresivo (en curva exponencial basado en Microsoft Excel) de hasta diez veces en los niveles de expresión de la proteína NS1 del Nd a medida que las células fueron tratadas con cantidades crecientes de α 2-3NA (Figura 23C, derecha). De nuevo los niveles de infección del wt disminuyeron de forma exponencial al incrementar la dosis de enzima α 2-3,6,8NA, mientras que la infección del Nd disminuyó en menor grado a dosis elevadas y se benefició en el intervalo 0-40 U/ μ l con un máximo de más de diez veces a la dosis de 5 U/ μ l (Figura 23D). La distinta sensibilidad de la infección por los viriones wt y Nd a los dos tipos de NA (i) sugirió un uso de distintos tipos de sia como receptor(es) para infectar también células U373MG; y (ii) evidenció de nuevo la falta de correlación entre unión e infección del virión Nd a bajas dosis de NAs.

4.3. Efecto de la unión a ácido siálico en la entrada de los viriones wtMVM y Nd.

Los resultados obtenidos en los análisis de unión e infección de dos tipos celulares por los viriones wt y Nd (Figura 22 y Figura 23) evidenciaron diferencias en el uso de tipos de sia como receptores, así como en la interacción celular. Procedimos a continuación a analizar dos etapas de la interacción virus-célula que pudiesen ser responsables de estas diferencias. En un primer estudio analizamos la afinidad de unión al receptor de las cápsidas de los viriones, determinando su cinética de adsorción a la superficie de células NB324K a lo largo del tiempo. El ensayo se efectuó midiendo la cantidad de proteínas estructurales (VP1, VP2, y VP3) unidas a lo largo de 100 minutos a 4 °C, para bloquear etapas subsecuentes a la adsorción. Los resultados mostraron la ausencia de diferencias significativas en la capacidad de adsorción de los viriones wt y Nd a células NB324K (Figura 24A).

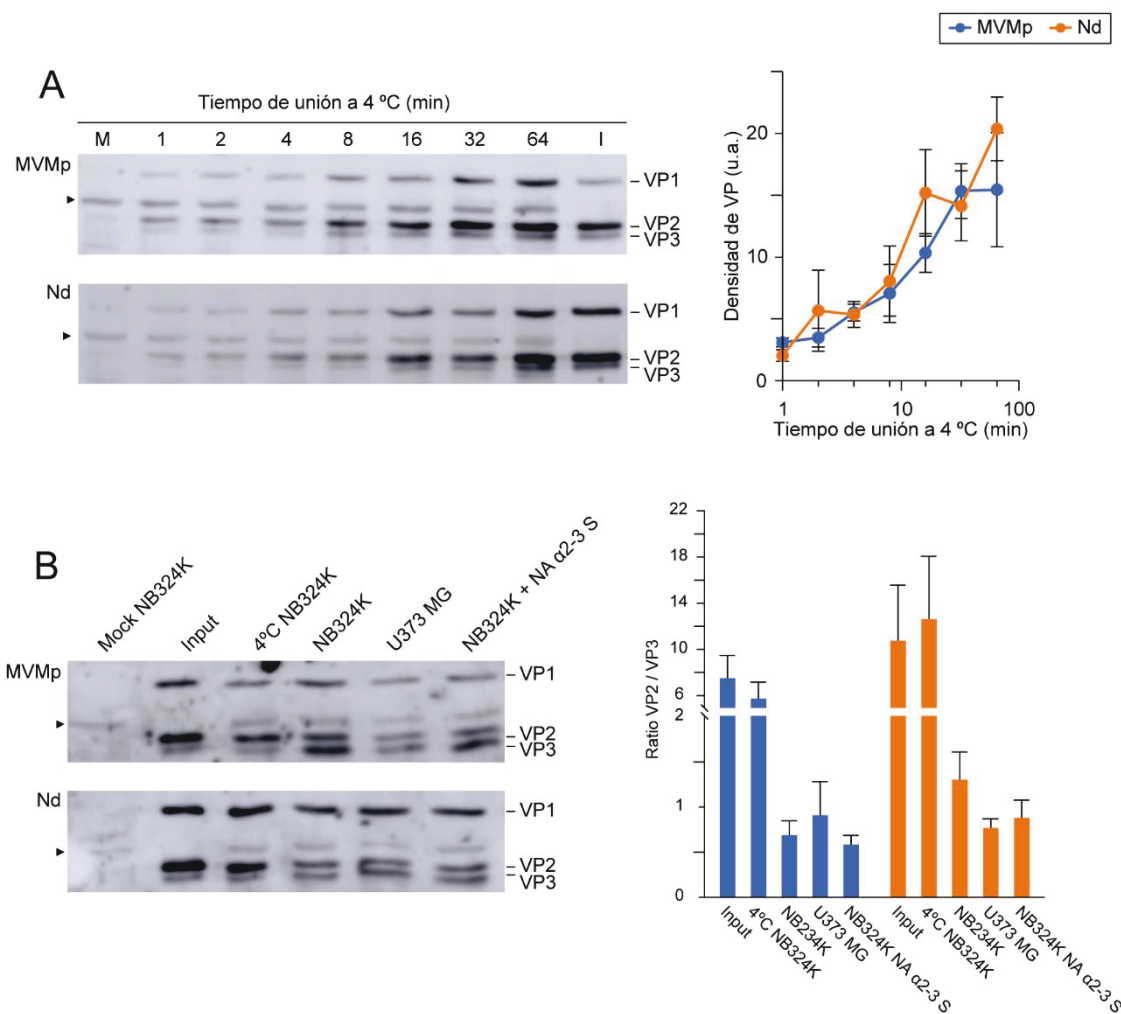


Figura 24. Análisis de afinidad y entrada del MVMwt y la quimera Nd en células NB324K. (A) Cinética de adsorción a células NB324K. Se muestra la unión a 4 °C de partículas purificadas del virus MVMp y de la quimera Nd a células NB324K a lo largo del tiempo. Izquierda: proteínas estructurales unidas (VP1, VP2 y VP3) detectadas mediante western-blot. Derecha: gráfica con valores cuantitativos de unión obtenidos de western-blot, correspondientes a las medias con error standard a partir de tres experimentos independientes. M, Mock; I, *input*. (B) Procesamiento de VP2 a VP3 en células NB324K y U373 MG. Izquierda: análisis representativo por western-blot del corte VP2 / VP3 del virus MVMp y de la quimera Nd en células NB324K y U373MG tras 2,5 hpi en presencia / ausencia de la NA α 2-3 S a dosis $1,2 \cdot 10^{-2}$ U/ μ l. Se indican las proteínas estructurales virales unidas (VP1, VP2 y VP3). Derecha: valores cuantitativos del procesamiento de VP2 a VP3 obtenidos de western-blot correspondientes a las medias con error standard de tres a cinco experimentos independientes. La cabeza de flecha indica la proteína VP del suero. u.a., unidades arbitrarias de densitometría.

Finalmente, procedimos a analizar una posible diferencia entre los dos viriones en la etapa siguiente a la adsorción, la entrada en las células al inicio de la infección. En MVM esta etapa puede monitorizarse por el corte de la secuencia N-terminal de la VP2 (Sánchez-Martínez et al. 2012) que facilita la exposición del extremo VP1 (Sánchez-Martínez et al. 2012) que porta la actividad fosfolipasa para salir del endosoma (Ros et al. 2017; Zádori et al. 2001). Este procesamiento VP2/VP3 no sucede en los viriones wt y Nd unidos a 4 °C pero si en los internalizados a 37 °C, marcando efectivamente el inicio

Resultados

de la infección (Figura 24B). Para el wtMVM el corte VP2 / VP3 sucede con ligera mayor eficacia en NB324K que en U373 MG, mientras que para el virión Nd el procesamiento en U373 MG es significativamente mayor que en NB324K, en correspondencia con el tropismo relativo de estos virus en ambos tipos celulares medidos por expresión de NS1 (Figura 19). Además, pudimos observar que el tratamiento con NA α -2,3 S (en células NB324K) a dosis que incrementan la expresión génica del Nd, pero no del wtMVM, inducía un corte más eficiente de VP2 solo en la interacción con Nd. Estos resultados demostraron que el diferente tropismo y capacidad de infección de los virus wtMVM y Nd se relacionan con el efecto que la interacción con sia determina, no en la unión, si no en los cambios estructurales de la partícula viral durante el proceso de la entrada.

DISCUSIÓN

En este trabajo se combinaron dos importantes áreas paralelas de la clínica e investigación actual en la terapia del cáncer, los anticuerpos α -VEGF y los virus oncolíticos, con el objetivo de dotar al parvovirus *Minute Virus of Mice* (MVM) con propiedades antiangiogénicas. El MVM es un parvovirus que recientemente ha ganado reputación por su potencia inherente oncolítica contra glioblastoma y otros tumores (Gil-Ranedo et al. 2021). MVM infecciosos que expongan VEbp en la superficie de la cápsida podrían utilizarse como vacunas terapéuticas para inducir anticuerpos neutralizantes anti-VEGF, así como para dirigir la actividad citolítica del virus hacia células transformadas que sobre-expresen VEGFR-1; con ambas estrategias se podría de forma sinérgica inhibir la angiogénesis y el crecimiento tumoral. Para estos objetivos, la cápsida del MVM fue modificada mediante ingeniería genética sustituyendo residuos con VEbp de alta afinidad en distintos dominios, en el eje 3X dentro de un epítipo inmunogénico principal, y en el eje 2X en una depresión u hoyuelo que dirige el tropismo del virus. Además se insertaron algunos péptidos en el extremo N-terminal de la VP2. En las manipulaciones que permitieron recuperar viriones quiméricos ensamblados, se analizaron extensivamente distintas propiedades biológicas relevantes: infectividad, exposición de los péptidos en las cápsidas, evasión a la neutralización, inducción de anticuerpos anti-VEGF, estabilidad genética, tropismo, y uso de receptores para unión e infección de células transformadas humanas.

Virus quiméricos MVM-VEbp pueden ensamblarse y ser infecciosos. El reemplazo de las secuencias wt en el bucle 4 de la espícula en el eje 3X de la cápsida del MVM por el péptido P6L permitió la propagación del virus quimérico resultante en cultivo (Figura 8A) de acuerdo con su eficiente replicación y empaquetamiento del genoma (Figura 8B) y un patrón de ensamblaje de la cápsida similar al del wtMVM (Figura 14, arriba). El mantenimiento de las principales funciones de la cápsida intra y extracelulares en el ciclo del MVM-P6L fue compatible con la exposición en la superficie del péptido P6L, lo que permitió su reconocimiento significativo por el anticuerpo policlonal α -P6L específico (Figura 10) y la neutralización de la infectividad (Figura 11). La(s) configuración(es) del péptido P6L en la espícula permitieron contactos entre los residuos de las tres subunidades VP para formar la espícula, en una solución estructural que era genéticamente estable tras varios pases del virus en cultivo (Figura 13). Estos datos demuestran que el bucle 4 es un sitio adecuado para la disposición superficial de péptidos heterólogos en MVM infecciosos, así como en parvovirus relacionados estructuralmente.

Pero los VEbp pueden alterar el ensamblaje nuclear de la cápsida del MVM. Esto se observó al estudiar la infectividad de MVM-A7R, cuyo empaquetamiento de genoma y rendimiento de cápsidas ensambladas se vieron severamente alterados en comparación con estos parámetros del wtMVM y del MVM-P6L (Figura 8). Análisis previos genéticos y bioquímicos demostraron que el ensamblaje de MVM depende de la translocación de los intermedios triméricos a través de la envoltura nuclear, lo que es dirigido por un motivo de localización nuclear estructurado (NLM) (Almendral 2013; Lombardo et

al. 2000; Riobos et al. 2006, 2010). Se propuso que los motivos de transporte estructurados pueden proporcionar un control de calidad para la ruta de ensamblaje de la cápsida (Lombardo et al. 2000), un concepto que también se sugirió posteriormente para otros parvovirus (Boisvert et al. 2014; Pillet et al. 2003). Las subunidades quiméricas VP-A7R se acumularon en los núcleos de las células transfectadas (Figura 10A), lo que demuestra que el péptido A7R no perturba la configuración de la NLM en los trímeros. Sin embargo, las subunidades de VP-A7R acumuladas en el núcleo mostraron un defecto patente en el ensamblaje, en forma de grandes ensamblados y/o agregados supravirales heterogéneos que contenían algunas partículas virales embebidas (Figura 9). Este patrón sugiere que el péptido A7R bloquea la ruta de ensamblaje del MVM al nivel del cambio estructural que las subunidades deben experimentar para configurar el epítipo de unión del anticuerpo monoclonal α -B7 en el eje 3X de la superficie de la cápsida (Kaufmann et al. 2007); este epítipo no puede ser conformado por trímeros expresados en células (Riobos et al. 2006) ni purificados *in vitro* (Riobos et al. 2010). Las dos prolinas contiguas pueden imponer una alta rigidez al péptido A7R, restringiendo la flexibilidad conformacional requerida para el plegamiento de las subunidades entrelazadas en el eje 3X de la cápsida (Tsao et al. 1991; Xie et al. 2002). Unos contactos aberrantes entre las cadenas laterales de los residuos del A7R entre subunidades vecinas en el eje 3X pueden conducir al ensamblaje incorrecto y a la agregación observados en los análisis de sedimentación (Figura 9 y Figura 14). En este sentido, es interesante recordar que ya se disponía de evidencias previas sobre la rigidez del péptido A7R, al estudiar la dificultad de exposición de los extremos N terminales de VP2 y VP1 a través del poro de la cápsida, un proceso necesario para que MVM inicie la infección (Sánchez-Martínez et al. 2012).

Interacción inmune de las quimeras MVM-VEbp. En nuestro análisis de los virus quiméricos utilizamos anticuerpos específicos anti-VEbp para determinar su exposición en la superficie de las cápsidas. El plegamiento y reordenamiento de las subunidades que acompañan al ensamblaje de la cápsida podría imponer restricciones en la configuración de los VEbp. Así el péptido P6L fue reconocido específicamente por el anticuerpo policlonal anti-P6L, tanto en proteínas VP quiméricas como en virus purificados (Figura 10 y Figura 11). Es interesante recordar que P6L se seleccionó como un péptido que mimetiza el VEGF en su unión a neuropilina-1 y VEGFR-1 (Giordano et al. 2001), aunque tiene múltiples conformaciones interactivas y motivos de unión superpuestos (Giordano et al. 2005). Por lo tanto, el reconocimiento y neutralización parcial de MVM-P6L por el anticuerpo anti-P6L indica que el ensamblaje de la cápsida no enmascara todos los epítipos de P6L. Análisis estructurales de alta resolución y de inmunogenicidad ayudarían a determinar la configuración precisa de los epítipos de este VEbp en la cápsida quimérica.

El péptido A7R en solución adquiere una estructura secundaria que imita el dominio C-terminal de VEGF (Starzec et al. 2007), y su configuración nativa se pudo rastrear con el mAb α -A7R (Binétruy-

Tournaire et al. 2000) usado en este estudio. A7R se pudo reconocer de forma débil pero específicamente por este anticuerpo tanto en células que expresan VP quiméricas, como en partículas virales unidas a filtros (Figura 10A y B), pero no en viriones MVM-A7R unidos a rejillas de ME (Figura 10C). Además, el anticuerpo α -A7R no logró neutralizar MVM-A7R crecido en cultivo (Figura 11), un resultado al que también puede contribuir la mutación P6Q que se selecciona en la secuencia A7R (Figura 13; discutido más abajo). Estos datos indican que la configuración nativa del péptido A7R está severamente restringida por una distorsión estructural en el eje 3x impuesta por la cápsida MVM. Sin embargo, las cápsidas vacías de MVM-A7R indujeron títulos detectables de anticuerpos anti-VEGF en ratones (Figura 12), lo que indica que el péptido A7R insertado retiene epítomos inmunogénicos nativos. Puesto que el mAb α -A7R neutraliza VEGF y posee propiedades antiangiogénicas e inhibidoras de tumores (Starzec et al. 2006), es esperable que los anticuerpos policlonales anti-VEGF inducidos en ratones por la cápsida quimérica MVM-A7R también alberguen capacidades de neutralización de VEGF e inhibición tumoral. Es por ello que la capacidad anticancerosa de vacunas basadas en quimeras MVM-A7R merece una investigación exhaustiva.

Un tema crucial para la aplicación terapéutica de los parvovirus es la inmunidad pre-existente (Louis Jeune et al. 2013). Dado que la cápsida de parvovirus es altamente inmunogénica, anticuerpos neutralizantes prevalecen en poblaciones humanas y animales tras exposiciones naturales. Por ejemplo, la respuesta inmune humoral contra MVM en ratones portadores de tumores previene la transcripción viral (Lang et al. 2006), y los pacientes que buscan inscribirse en ensayos de terapia génica con vectores AAV deben tener títulos de anticuerpos anti-AAV neutralizantes bajos (p. ej., ClinicalTrials. número de registro de gobierno NCT01620801). En este sentido, es importante destacar que el eje prominente de simetría 3X forma el dominio más inmunogénico de las cápsidas de parvovirus mejor estudiadas antigénicamente (Bloom et al. 2001; Gurda et al. 2013; Hafenstein et al. 2009; Langeveld et al. 1993; Tse et al. 2017; Tseng et al. 2014), lo que podría conferir a las quimeras del eje 3X una cierta capacidad de evasión inmune. De acuerdo con esta predicción, los virus quiméricos MVM-P6L y MVM-A7R fueron completamente resistentes al B7-mAb que neutraliza eficientemente el MVMwt (Figura 11); y además el MVM-PL6 eludía, en parte, títulos elevados del anticuerpo policlonal anti-MVM que neutraliza eficazmente el virus wt (Grueso et al. 2019). En suma, nuestros datos sugieren que reemplazar epítomos de anticuerpos neutralizantes con péptidos heterólogos puede delinear un enfoque eficaz hacia el desarrollo de parvovirus terapéuticos con propiedades privilegiadas de evasión inmune.

La evolución de parvovirus puede modificar péptidos heterólogos. A pesar de su importancia, la estabilidad genética de las cápsidas ha recibido poca atención durante la extensa manipulación de los genomas de parvovirus y la tecnología de vectorización. Nosotros abordamos el impacto de la evolución en la estabilidad genética de las quimeras MVM-VEbp, dada la rápida respuesta evolutiva del MVM previamente descrita a otras presiones biológicas ejercidas sobre su cápsida, como fueron la neutralización por anticuerpos (López-Bueno et al. 2003, 2004) y la virulencia adaptativa (Rubio et al. 2005; López-Bueno et al. 2006, 2008). Pudimos observar que la sustitución de residuos wt dentro del bucle 4 por el péptido A7R no dio como resultado la selección de mutaciones compensatorias en los otros bucles que forman la espícula, lo que puede obedecer a la falta de contactos con la región manipulada (Figura 13). Sin embargo, al pasar en cultivo MVM-A7R se seleccionó el cambio de aminoácido P6Q dentro del péptido exógeno, lo que restauró la eficiencia del ensamblaje de la cápsida (Figura 14) y la capacidad de formación de placas (Figura 13). Este cambio evolutivo explica tanto la lenta progresión de MVM-A7R en cultivo en comparación con los virus wt y MVM-P6L (Figura 8A), como el escaso reconocimiento (Figura 10) y neutralización (Figura 11) por el anticuerpo anti-A7R. El cambio de P6Q se encontró consistentemente al pasar dos cultivos independientes de MVM-A7R, lo que sugiere que es una solución estructural preferente para superar su defecto de ensamblaje. La determinación de la estructura de la cápsida MVM-A7R-P6Q a alta resolución podría explicar cómo los contactos impulsados por la disposición de la cadena lateral de glutamina estabilizan las interacciones en el eje 3X de la espícula quimérica. El mutante P6Q puede inspirar futuras manipulaciones que eviten las restricciones estructurales impuestas en el eje 3X. Este análisis evolutivo sugiere también problemas de bioseguridad no considerados en la administración terapéutica a gran escala de quimeras de parvovirus infecciosos y vectores replicativos.

Manipulando el tropismo del MVM. La relevancia del VEGF en la neovascularización de tumores está impulsando múltiples enfoques experimentales anti-VEGF, incluidos los basados en oncolisis viral (Rhim and Tosato 2007). Nosotros hemos intentado reorientar la infección del parvovirus MVM a la vasculatura del tumor mediante la ingeniería de su cápsida con péptidos VEbp. Esta aproximación experimental se llevó a cabo sustituyendo residuos wt de la espícula (3X) y del hoyuelo (2X) por los péptidos VEbp, así como con algunas inserciones en el extremo N-terminal de las proteínas VPs.

Al analizar la tolerancia estructural a estas manipulaciones, se observó una elevada permisividad del ensamblaje de la cápsida a las sustituciones de los residuos del hoyuelo por los tres péptidos exógenos (A7R (A), P6L (P) y N6G (N)), lo que puede explicar por qué este dominio evoluciona fácilmente a variantes patogénicas del MVM en la infección del ratón (López-Bueno et al. 2008). Sin embargo, en el eje 3X solo el péptido P permitió un ensamblaje de la cápsida eficaz, quizás porque los residuos del péptido P, incluidas las prolinas, pueden conferir contactos adecuados en ese dominio. La inserción

(aunque no sustitución) del péptido A en los dominios VP-Nt altamente flexibles de las subunidades VP1 y VP2, que de hecho no se resuelven en la estructura cristalina de la cápsida (Agbandje-McKenna et al. 1998; Kontou et al. 2005), produjo viriones ensamblados desprovistos de infectividad, ya que estos dominios flexibles deben ser expuesto a través del poro 5X para iniciar la infección (Sánchez-Martínez et al. 2012; Castellanos et al. 2013) Este defecto de la infección no pudo ser rescatado por la sustitución de residuos del hoyuelo con ninguno de los tres péptidos (A, P y N) (Tabla III). En resumen, esta aproximación nos proporcionó algunos virus quiméricos (portadores de péptidos en el hoyuelo y en la espícula) que ensamblaban la cápsida y empaquetaban el genoma, con los que analizar cambios de tropismo del MVM.

De todos ellos, solo los virus quiméricos con el péptido N en el hoyuelo (Nd), el P en la espícula (Ps), o la combinación (Nd Ps), pudieron ser crecidos y purificados a gran escala y resultaron infecciosos en las células ensayadas (Figura 16, 17 y 19). Si las otras quimeras no infecciosas en las células NB324K pueden infectar otros tipos celulares a través del reconocimiento de receptores desconocidos, es una posibilidad remota pero que no ha sido descartada. Las quimeras Nd, Ps y NdPs se vieron disminuidas en su capacidad de hemaglutinación y de infección (Figura 16 y 17), pero la infectividad específica de las quimeras Nd y NdPs hacia células de glioblastoma humano U373 MG fue mayor que la del wt y la quimera Ps (Figura 19). Por tanto, de alguna forma (ver más abajo), el tropismo del MVM se altera al sustituir algunos residuos del hoyuelo con el péptido N. Ahora bien, ninguno de estos virus quiméricos pudo unirse a VEGFR-1 en células NB324K y U373 MG (Figura 20C), a pesar de la alta afinidad de unión inherente a VEGFR-1 de los péptidos P y N (Giordano et al. 2001). Por tanto, una observación novedosa e importante de este estudio ha sido demostrar como el proceso de ensamblaje de la cápsida distorsiona la configuración funcional de péptidos exógenos insertados en la espícula y en el hoyuelo.

Las restricciones que hemos observado para re-dirigir el tropismo del MVM con los VEBp exógenos, ya que en ningún caso se consiguió que las cápsidas quiméricas unieran VEGFR-1, es coherente con el fracaso común al intentar reorientar el tropismo de parvovirus mediante diseño racional con péptidos exógenos (Büning and Srivastava 2019; Castle et al. 2016; Rommelaere et al. 2010). De hecho, aunque se dispone de una amplísima colección de vectores de AAV re-orientados hacia diferentes tipos de células o tejidos (ver Tabla I en Introducción), generalmente se desconoce los receptores que usan *in vivo*. Incluso, cuando se ha pretendido re-dirigir AAV hacia un determinado receptor mediante ingeniería extensiva de variantes de tropismo tisular, la infección suele involucrar receptores insospechados distintos de la diana que se pretendía en el diseño original. Una excepción importante son los vectores AAV que reconocen el dominio RGD de integrinas en la superficie celular, una unión favorecida por tratarse de una secuencia muy corta que es accesible con pocos contactos a través de

residuos no estructurados en la superficie de la cápsida (ver Tabla II, de Introducción) En nuestro estudio, los tres tipos diferentes de péptidos bloqueantes de VEGF insertados en el hoyuelo fueron incapaces de dirigir una unión infecciosa del MVM al receptor VEGFR-1. Por el contrario, en dos casos se eliminaba la infectividad y en un caso (Nd) la infección fue dependiente de tipos de sia. Este fenómeno fue específico del hoyuelo, no se observó en la quimera Ps, por lo que la espícula de la cápsida no parece estar involucrada en la unión ni infección del virus. La dificultad de re-dirigir MVM hacia receptores proteicos puede deberse por tanto a que su determinante de tropismo está localizado en el hoyuelo, un dominio deprimido y estructurado de la cápsida, adaptado evolutivamente a reconocer, en exclusiva, pequeños azúcares.

El ácido siálico en la unión productiva y no productiva de wtMVM y quimeras-VEbp. El cambio de tropismo del virus Nd quimérico (medido como relación de infección NB324K/U373MG) no se debió a un reconocimiento del VEGFR-1, sino al uso de receptores de ácido siálico, ya que tanto la unión como la infección fueron totalmente sensibles a NAs en ambas células (Figura 21 y 23). Este resultado es coherente con que diferentes tipos de ácido siálico explican en buena medida el tropismo de las cepas naturales MVMp y MVMi (Halder et al. 2014; Nam et al. 2006).

Ahora bien, la sensibilidad a los dos tipos de NA empleadas fue distinta entre el MVMwt y el Nd, como lo fue también las dosis a las que ambos virus se unen, pero pueden o no infectar. Por tanto, el tipo de siálico usado por cada virus para unirse e infectar, pero también la complejidad de los árboles de siálicos en los glicanos de la superficie celular, podría explicar el diferente comportamiento de estos virus frente a las NAs. Una diferencia importante entre ambos virus es que la mayoría de los sitios de unión Nd-sia son abortivos, ya que no llevan a la expresión de NS1, si bien el sia está involucrado en todos los contactos y en ambos tipos de células. La Figura 25 ilustra dos escenarios propuestos como hipótesis para explicar el diferente comportamiento de estos virus frente a NAs. En ambos casos, la proporción de viriones Nd que encuentran la vía de unión productiva aumenta sustancialmente al eliminar parte de la complejidad de los árboles siálicos con NAs; esto puede ser debido a que los receptores funcionales están enmascarados por pseudo-receptores (hipótesis A), o que la profusión o afinidad de los contactos de Nd con los receptores, comunes al MVMwt, retienen el tráfico del virión si no son relajados por NAs (hipótesis B). En cualquier caso, la unión productiva del virus Nd que se puede trazar por el corte de VP2 a VP3 y que lleva a la exposición de VP1 en el endosoma (Farr et al. 2006; Ros et al. 2017; Sánchez-Martínez et al. 2012), se facilita al disminuir la complejidad de receptores sia en la superficie celular por NAs (Figura 24B y 25). Las NAs facilitan pues el tráfico hacia el interior celular o la accesibilidad a las proteasas del extremo N-terminal de VP2.

Esto sugiere que puede ser posible re-dirigir el tropismo modificando el uso de siálicos. Genotecas aleatorias, quizás sin un diseño racional, podrían proporcionar péptidos funcionales para un receptor determinado.

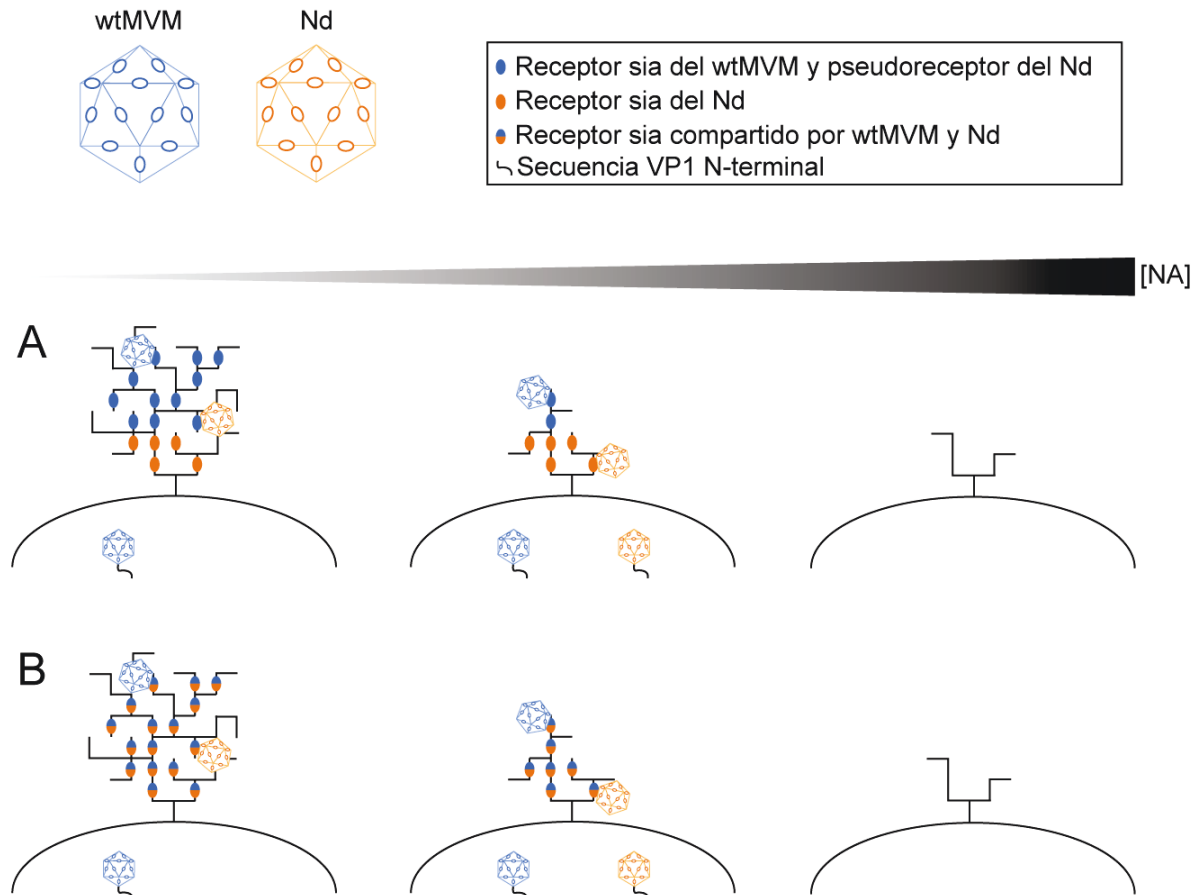


Figura 25. Modelos hipotéticos sobre el uso de receptores de ácido siálico por MVMp y la quimera MVM-Nd. Arriba, izquierda: cápsidas wt y Nd mostrando el dominio en el hoyuelo que actúa de sitio de unión de receptor; derecha: distintos tipos de receptores de sia y exposición de la secuencia VP1-N terminal que sigue al procesamiento de VP2 a VP3 requerido para la entrada infecciosa de la partícula viral. *Hipótesis (A):* Los viriones MVMp y Nd se unen a tipos de sia abundantes en los árboles de azúcares que actúan como receptores para el wt, pero como pseudo-receptores para el Nd, ya que esta unión no lleva a su entrada infecciosa. A dosis bajas de neuraminidasa (NA) ambos virus infectan, ya que los receptores funcionales de Nd, que son otros tipos de sia, devienen más accesibles. Dosis elevadas de NA eliminan los receptores de ambos virus y no pueden infectar. *Hipótesis (B):* MVMp y Nd utilizan los mismos receptores sia para unir e infectar, pero los viriones Nd se quedan atrapados en la red de azúcares por interacciones múltiples siendo incapaces de entrar en las células. A dosis bajas de NA los árboles de azúcares se relajan en su complejidad, permitiendo que ambos virus puedan entrar e infectar. A dosis elevadas de NA que eliminan los receptores sia ninguno de los viriones puede unirse ni infectar.

Comentarios finales. Este estudio muestra que el reemplazo de secuencias cortas de aminoácidos por péptidos heterólogos, y no simplemente inserciones, es una estrategia más avanzada para modificar la cápsida de parvovirus mediante diseño racional usando ingeniería genética. Las ventajas de este enfoque se ilustraron mediante ingeniería de la cápsida del parvovirus MVM con VEbp antiangiogénicos, lo que permitió obtener virus quiméricos infecciosos capaces de inducir anticuerpos α -VEGF, de evadir neutralización por anticuerpos α -MVM, y de infectar con mayor eficacia relativa (tropismo aumentado) células de glioblastoma humano. Estos parvovirus quiméricos pueden aportar importantes beneficios terapéuticos sobre los regímenes pasivos basados en anticuerpos α -VEGF de uso actual en pacientes con cáncer diversos.

Esta estrategia sin embargo no está exenta de dificultades, algunas de las cuales pudieron ser desveladas en nuestro estudio. Por ejemplo, la flexibilidad de las secuencias de los péptidos introducidos en ciertos dominios puede imponer restricciones estructurales severas en el ensamblaje de la cápsida. Este fue el caso de las inserciones en la espícula 3X que solo toleraron el péptido P, cuya abundancia en prolinas le confirió un grado elevado de analogía estructural con el dominio a reemplazar, mientras que otros péptidos condujeron a la selección de variantes virales con mayor viabilidad pero que portan alteraciones en la secuencia del péptido introducido. O en el hoyuelo del eje 2X donde la imposición de una configuración en este dominio por el ensamblaje de las subunidades impidió que los VEbp insertados dirigieran la unión de la cápsida al VEGFR-1.

Para futuras manipulaciones, sería interesante considerar otros péptidos cuyas funciones tengan menos requisitos estructurales, o inserciones en otros dominios de la cápsida con diferentes topologías de superficie. En cualquier caso, es probable que continúe siendo difícil obtener quimeras replicativas y genéticamente estables del MVM, que expongan en la superficie de la cápsida péptidos determinantes del tropismo del virus o inmuno-dominantes.

CONCLUSIONES

1. Virus MVM quiméricos con los péptidos P6L y A7R insertados en la espícula de la cápsida sustituyendo residuos del wt, presentan una morfología normal e inducen la síntesis de los intermediarios replicativos RF-I y RF-II del genoma, aunque A7R dificulta el ensamblaje de la cápsida.
2. La mutación P6Q (posición 6 del péptido A7R) seleccionada de forma natural en cultivo restaura la capacidad de ensamblaje de la cápsida quimérica y la formación de placas de lisis.
3. Ensayos de neutralización indican que el péptido P6L se expone en la superficie de la espícula en conformación reconocible por un anticuerpo específico, pero no así el péptido A7R, lo que sugiere distorsiones estructurales en la configuración de los péptidos exógenos impuestas durante el ensamblaje de la cápsida.
4. Cápsidas vacías quiméricas con el péptido A7R en la espícula inducen la producción de anticuerpos específicos anti-VEGF en ratón, pero no si se inyectan los viriones quiméricos, lo que sugiere que la evolución hacia la variante MVM-A7R-P6Q pueda suceder *in vivo*.
5. Las quimeras Nd, Ps y la doble NdPs conservan capacidad lítica similar al wt, aunque el fenotipo de sus placas de lisis indica restricciones en su propagación inter-celular.
6. En las manipulaciones del hoyuelo (eje 2X), solo la quimera MVM-N6G demostró una infectividad específica significativa, que fue mayor que la del wt hacia células de glioblastoma humano, aunque no une ni infecta a través de VEGF-R si no por ácidos siálicos.
7. La relajación de entramados de glicanos de la superficie celular con bajas dosis de las neuraminidasas α -3 S y α -3,6,8 incrementa muy significativamente la capacidad infecciosa del virus MVM-N6G unido, al facilitar el procesamiento intracelular de VP2 requerido para iniciar la infección.
8. Por tanto, la sustitución de péptidos en dominios funcionales de las cápsidas icosaédricas de Parvovirus permite manipular el tropismo al modular las transiciones estructurales que siguen a la unión a ácidos siálicos en los árboles de glicanos, cuya composición es dependientes del tipo celular.

BIBLIOGRAFÍA

- Adelfinger, M., Gentschev, I., de Guilbert, J.G., Weibel, S., Langbein-Laugwitz, J., Härtl, B., Escobar, H.M., Nolte, I., Chen, N.G., Aguilar, R.J., Yu, Y.A., Zhang, Q., Frentzen, A., Szalay, A.A., 2014. Evaluation of a New Recombinant Oncolytic Vaccinia Virus Strain GLV-5b451 for Feline Mammary Carcinoma Therapy. *PLoS ONE* 9, e104337. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0104337>
- Agbandje-McKenna, M., Llamas-Saiz, A.L., Wang, F., Tattersall, P., Rossmann, M.G., 1998. Functional Implications of the Structure of the Murine Parvovirus, Minute Virus of Mice. *Structure* 6, 1369–1381. [https://doi.org/10.1016/s0969-2126\(98\)00137-3](https://doi.org/10.1016/s0969-2126(98)00137-3)
- Almendral, J.M., 2013. Assembly of Simple Icosahedral Viruses. *Subcell Biochem* 68, 307–328. https://doi.org/10.1007/978-94-007-6552-8_10
- Antonietti, J.P., Sahli, R., Beard, P., Hirt B., 1988. Characterization of the Cell Type-Specific Determinant in the Genome of Minute Virus of Mice. *J Virol* 62, 552–557. <https://doi.org/10.1128/jvi.62.2.552-557.1988>
- Appelmann, I., Liersch, R., Kessler, T., Mesters, R.M., Berdel, E., 2010. Angiogenesis Inhibition in Cancer Therapy: Platelet-Derived Growth Factor (PDGF) and Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF) and Their Receptors: Biological Functions and Role in Malignancy. *Recent Results Cancer Res* 1780, 51-81. https://doi.org/10.1007/978-3-540-78281-0_5
- Apte, R., Chen, D.S., Ferrara, N., 2019. VEGF in Signaling and Disease: Beyond Discovery and Development. *Cell* 176, 1248–1264. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2019.01.021>
- Astell, C.R., Gardiner, E.M., Tattersall, P., 1986. DNA Sequence of the Lymphotropic Variant of Minute Virus of Mice, MVM(i), and Comparison with the DNA Sequence of the Fibrotropic Prototype Strain. *J Virol* 57, 656–669. <https://doi.org/10.1128/jvi.57.2.656-669.1986>
- Asuri, P., Bartel, M.A., Vazin, T., Jang, J.H., Wong, T.B., Schaffer, D.V., 2012. Directed Evolution of Adeno-Associated Virus for Enhanced Gene Delivery and Gene Targeting in Human Pluripotent Stem Cells. *Molecular Therapy* 20, 329–338. <http://dx.doi.org/10.1038/mt.2011.255>
- Bashir, T., Hörlein, R., Rommelaere, J., Willwand, K., 2000. Cyclin A Activates the DNA Polymerase δ -Dependent Elongation Machinery in Vitro: A Parvovirus DNA Replication Model. *Proc Natl Acad Sci USA* 97, 5522–5527. <https://doi.org/10.1073/pnas.090485297>
- Bazan-Peregrino, M., Sainson, R.C.A., Carlisle, R.C., Thoma, C., Waters, R.A., Arvanitis, C., Harris, A.L., Hernandez-Alcoceba, R., Seymour, L.W., 2013. Combining Virotherapy and Angiotherapy for the Treatment of Breast Cancer. *Cancer Gene Ther* 20, 461–468. <https://doi.org/10.1038/cgt.2013.41>
- Binetruy-Tournaire, R., Demangel, C., Malavaud, B., Vassy, R., Rouyre, S., Kraemer, M., Plouët, J., Derbin, C., Perret, G., Mazié, J.C., 2000. Identification of a Peptide Blocking Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF)-Mediated Angiogenesis. *EMBO Journal* 19, 1525–1533. <https://doi.org/10.1093/emboj/19.7.1525>
- Bloom, M.E., Best, S.M., Hayes, S.F., Wells, R.D., Wolfenbarger, J.B., McKenna, R., Agbandje-McKenna, M., 2001. Identification of Aleutian Mink Disease Parvovirus Capsid Sequences Mediating Antibody-Dependent Enhancement of Infection, Virus Neutralization, and Immune Complex Formation. *J Virol* 75, 11116–11127. <https://doi.org/10.1128/JVI.75.22.11116->

[11127.2001](#)

- Bodendorf, U., Cziepluch, C., Jauniaux, J.C., Rommelaere, J., Salomé, N., 1999. Nuclear Export Factor CRM1 Interacts with Nonstructural Proteins NS2 from Parvovirus Minute Virus of Mice. *J Virol* 73, 7769–7779. <https://doi.org/10.1128/jvi.73.9.7769-7779.1999>
- Boisvert, M., Bouchard-Levesque, V., Fernandes, S., Tijssen, P., 2014. Classic Nuclear Localization Signals and a Novel Nuclear Localization Motif Are Required for Nuclear Transport of Porcine Parvovirus Capsid Proteins. *J Virol* 88, 11748–11759. <https://doi.org/10.1128/JVI.01717-14>
- Bonnard, G.D., Manders, E.K., Campbell Jr, D.A., Herberman, R.B., Collins Jr, M.J., 1976. Immunosuppressive Activity of a Subline of the Mouse EL-4 Lymphoma. *J Exp Med* 143, 187–205. <https://doi.org/10.1084/jem.143.1.187>
- Brownstein, D.G., Smith, A.L., Johnson, E.A., Pintel, D.J., Naeger, L.K., Tattersall, P., 1992. The Pathogenesis of Infection with Minute Virus of Mice Depends on Expression of the Small Nonstructural Protein NS2 and on the Genotype of the Allotropic Determinants VP1 and VP2. *J Virol* 66, 3118–3124. <https://doi.org/10.1128/jvi.66.5.3118-3124.1992>
- Büning, H., Srivastava, A., 2019. Capsid Modifications for Targeting and Improving the Efficacy of AAV Vectors. *Mol Ther Methods Clin Dev* 12, 248–265. <https://doi.org/10.1016/j.omtm.2019.01.008>
- Carmeliet, P., 2005. VEGF as a Key Mediator of Angiogenesis in Cancer. *Oncology* 69 Suppl. 3, 4–10. <https://doi.org/10.1159/000088478>
- Castellanos, M., Pérez, R., Rodríguez-Huete, A., Grueso, E., Almendral, J.M., Mateu, M.G., 2013. A Slender Tract of Glycine Residues Is Required for Translocation of the VP2 Protein N-Terminal Domain through the Parvovirus MVM Capsid Channel to Initiate Infection. *Biochem J* 455, 87–94. <https://doi.org/10.1042/bj20130503>
- Castle, M.J., Turunen, H.T., Vandenüerghe, L.H., Wolfe, J.H., 2016. Controlling AAV Tropism in the Nervous System with Natural and Engineered Capsids. *Methods Mol Biol* 1382, 133–149. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-3271-9_10
- Choi, E., Newman, A., Burger, L., Pintel, D., 2005. Replication of Minute Virus of Mice DNA Is Critically Dependent on Accumulated Levels of NS2. *J Virol* 79, 12375–12381. <https://doi.org/10.1128/jvi.79.19.12375-12381.2005>
- Choi, I., Shin, H., Oh, E., Yoo, J.Y., Hwang, J.K., Shin, K., Yu, D., Yun, C., 2015. Potent and Long-Term Antiangiogenic Efficacy Mediated by FP3-Expressing Oncolytic Adenovirus. *Int J Cancer* 137, 2253–2269. <https://doi.org/10.1002/ijc.29592>
- Choi, J., Jung, S., Kasala, D., Hwang, J.K., Hu, J., Bae, Y.H., Yun, C., 2015. PH-Sensitive Oncolytic Adenovirus Hybrid Targeting Acidic Tumor Microenvironment and Angiogenesis. *J Control Release* 205, 134–143. <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2015.01.005>
- Cotmore, S.F., D'Abramo Jr. A.M., Carbonell, L.F., Bratton, J., Tattersall, P., 1997. The NS2 Polypeptide of Parvovirus MVM Is Required for Capsid Assembly in Murine Cells. *Virology* 231, 267–280. <https://doi.org/10.1006/viro.1997.8545>
- Cotmore, S.F., Agbandje-McKenna, M., Chiorini, J.A., Mukha, D.V., Pintel, D.J., Qiu, J., Soderlund-

- Venermo, M., Tattersall, P., Tijssen, P., Gatherer, D., Davison, A.J., 2014. The Family Parvoviridae. *Arch of Virol* 159, 1239–1247. <https://doi.org/10.1007/s00705013-1914-1>.
- Cotmore, S.F., Agbandje-McKenna, M., Canuti, M., Chiorini, J.A., Eis-Hubinger, A., Hughes, J., Mietzsch, M., Modha, S., Ogliastro, M., Péntzes, J.J., Pintel, D.J., Qiu, J., Soderlund-Venermo, M., Tattersall, P., Tijssen, P., Ictv Report Consortium, 2019. ICTV Virus Taxonomy Profile: Parvoviridae. *J Gen Virol* 100, 367–368. <https://doi.org/10.1099/jgv.0.001212>
- Cotmore, S.F., Tattersall, P., 1987. The Autonomously Replicating Parvoviruses of Vertebrates. *Adv Virus Res* 33, 91–174. [https://doi.org/10.1016/s0065-3527\(08\)60317-6](https://doi.org/10.1016/s0065-3527(08)60317-6)
- Crawford, L V., 1966. A Minute Virus of Mice. *Virology* 29, 605–612. [https://doi.org/10.1016/0042-6822\(66\)90284-4](https://doi.org/10.1016/0042-6822(66)90284-4)
- Currier, M., Eshun, F.K., Sholl, A., Chernoguz, A., Crawford, K., Divanovic, S., Boon, L., Goins, W.F., Frischer, J.S., Collins, M.H., Leddon, J.L., Baird, W.H., Haseley, A., Streby, K.A., Wang, P., Hendrickson, B.W., Brekken, R.A., Kaur, B., Hildeman, D., Cripe, T.P., 2013. VEGF Blockade Enables Oncolytic Cancer Virotherapy in Part by Modulating Intratumoral Myeloid Cells. *Mol Ther* 21, 1014–1023. <https://doi.org/10.1038/mt.2013.39>
- Davidsson, M., Wang, G., Aldrin-Kirk, P., Cardoso, T., Nolbrant, S., Hartnor, M., Mudannayake, J., Parmar, M., Björklund, T., 2019. A Systematic Capsid Evolution Approach Performed in Vivo for the Design of AAV Vectors with Tailored Properties and Tropism. *Proc Natl Acad Sci USA* 116, 27053–27062. <https://doi.org/10.1073/pnas.1910061116>
- Davis, A.S., Federici, T., Ray, W.C., Boulis, N.M., O'Connor, D., Clark, K.R., Bartlett, J.S., 2015. Rational Design and Engineering of a Modified Adeno-Associated Virus (AAV1)-Based Vector System for Enhanced Retrograde Gene Delivery. *Neurosurgery* 76, 216–225. <https://doi.org/10.1227/neu.0000000000000589>
- Deverman, B.E., Pravdo, P.L., Simpson, B.P., Kumar, S.R., Chan, K.Y., Banerjee, A., Wu, W.L., Yang, B., Huber, N., Pasca, S.P., Gradinaru, V., 2016. Cre-Dependent Selection Yields AAV Variants for Widespread Gene Transfer to the Adult Brain. *Nat Biotechnol* 34, 204–209. <https://doi.org/10.1038/nbt.3440>
- Engelsma, D., Valle, N., Fish, A., Salomé, N., Almendral, J.M., Fornerod, M., 2008. A Supraphysiological Nuclear Export Signal Is Required for Parvovirus Nuclear Export. *Mol Biol Cell* 19, 2544–2552. <https://doi.org/10.1091/mbc.e08-01-0009>
- Faisst, S., Faisst, S.R., Dupressoir, T., Plaza, S., Pujol, A., Jauniaux, J.C., Rhode, S.L., Rommelaere, J., 1995. Isolation of a Fully Infectious Variant of Parvovirus H-1 Supplanting the Standard Strain in Human Cells. *J Virol* 69, 4538–4543. <https://doi.org/10.1128/jvi.69.7.4538-4543.1995>
- Farr, G.A., Cotmore, S.F., Tattersall P., 2006. VP2 Cleavage and the Leucine Ring at the Base of the Fivefold Cylinder Control PH-Dependent Externalization of Both the VP1 N Terminus and the Genome of Minute Virus of Mice. *J Virol* 80, 161–171. <https://doi.org/10.1128/jvi.80.1.161-171.2006>
- Ferrara, N., Robert, D.M., Campa, C., Kim, R., 2007. Targeting VEGF-A to Treat Cancer and Age-Related Macular Degeneration. *Annu Rev Med* 58, 491–504. <https://doi.org/10.1146/annurev.med.58.061705.145635>

Bibliografía

- Frederick, A., Sullivan, J., Liu, L., Adamowicz, M., Lukason, M., Raymer, J., Luo, Z., Jin, X., Rao, K.M., O'Riordan, C., 2020. Engineered Capsids for Efficient Gene Delivery to the Retina and Cornea. *Hum Gene Ther* 31, 756–774. <https://doi.org/10.1089/hum.2020.070>
- Frentzen, A., Yu, Y.A., Chen, N., Zhang, Q., Weibel, S., Raab, V., Szalay, A.A., 2009. Anti-VEGF Single-Chain Antibody GLAF-1 Encoded by Oncolytic Vaccinia Virus Significantly Enhances Antitumor Therapy. *Proc Natl Acad Sci USA* 106, 12915–12920. <https://doi.org/10.1073/pnas.0900660106>
- Geletneky, K., Hajda, J., Angelova, A.L., Leuchs, B., Capper, D., Bartsch, A.J., Neumann, J., Schöning, T., Hüsing, J., Beelte, B., Kiprianova, I., Roscher, M., Bhat, R., von Deimling, A., Brück, W., Just, A., Frehtman, V., Löbhard, S., Terletskaia-Ladwig, E., Fry, J., Jochims, K., Daniel, V., Krebs, O., Dahm, M., Huber, B., Uterberg, A., Rommelaere, J., 2017. Oncolytic H-1 Parvovirus Shows Safety and Signs of Immunogenic Activity in a First Phase I/IIa Glioblastoma Trial. *Mol Ther* 25, 2620–2634. <https://doi.org/10.1016/j.ymthe.2017.08.016>
- Gil-Ranedo, J., Hernando, E., Riolobos, L., Domínguez, C., Kann, M., Almendral, J.M., 2015. The Mammalian Cell Cycle Regulates Parvovirus Nuclear Capsid Assembly. *PLoS Pathog* 11, e1004920. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1004920>
- Gil-Ranedo, J., Hernando, E., Valle, N., Riolobos, L., Maroto, B., Almendral, J.M., 2018. Differential Phosphorylation and N-Terminal Configuration of Capsid Subunits in Parvovirus Assembly and Viral Trafficking. *Virology* 518, 184–194. <https://doi.org/10.1016/j.virol.2018.02.018>
- Gil-Ranedo, J., Gallego-García, C., Almendral, J.M., 2021. Viral Targeting of Glioblastoma Stem Cells with Patient-Specific Genetic and Post-Translational P53 Deregulations. *Cell Reports* 36, 109673. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2021.109673>
- Giordano, R.J., Cardó-Vila, M., Lahdenranta, J., Pasqualini, R., Arap, W., 2001. Biopanning and Rapid Analysis of Selective Interactive Ligands. *Nat Med* 7, 1249–1253. <https://doi.org/10.1038/nm1101-1249>
- Giordano, R.J., Anobom, C.D., Cardó-Vila, M., Kalil, J., Valente, A.P., Pasqualini, R., Almeida, F.C., Arap, W., 2005. Structural Basis for the Interaction of a Vascular Endothelial Growth Factor Mimic Peptide Motif and Its Corresponding Receptors. *Chem Biol* 12, 1075–1083. <https://doi.org/10.1016/j.chembiol.2005.07.008>
- Giordano, R.J., Cardó-Vila, M., Salameh, A., Anobom, C.D., Zeitlin, B.D., Hawke, D.H., Valente, A.P., Almeida, F.C.L., Nör, J.E., Sidman, R.L., Pasqualini, R., Arap, W., 2010. From Combinatorial Peptide Selection to Drug Prototype (I): Targeting the Vascular Endothelial Growth Factor Receptor Pathway. *Proc Natl Acad Sci USA* 107, 5112–5117. <https://doi.org/10.1073/pnas.0915141107>
- Girod, A., Ried, M., Wobus, C., Lahm, H., Leike, K., Kleinschmidt, J., Deléage, G., Hallek, M., 1999. Genetic Capsid Modifications Allow Efficient Re-Targeting of Adeno- Associated Virus Type 2. *Nat Med* 5, 1052–1056. <https://doi.org/10.1038/71021>
- Glaß, M., Söling, A., Messerle, M., 2008. Tumor-Specific Activity of Cellular Regulatory Elements Is down-Regulated upon Insertion into the Herpes Simplex Virus Genome. *J Neurovirol* 14, 522–535. <https://doi.org/10.1080/13550280802348214>

- Grekova, S., Zawatzky, R., Hörlein, R., Cziepluch, C., Mincberg, M., Davis, C., Rommelaere, J., Daeffler, L., 2010. Activation of an Antiviral Response in Normal but Not Transformed Mouse Cells: A New Determinant of Minute Virus of Mice Oncotropism. *J Virol* 84, 516–531. <https://doi.org/10.1128/jvi.01618-09>
- Grimm, D., Lee, J.S., Wang, L., Desai, T., Akache, B., Storm, T.A., Kay, M.A., 2008. In Vitro and In Vivo Gene Therapy Vector Evolution via Multispecies Interbreeding and Retargeting of Adeno-Associated Viruses. *J Virol* 82, 5887–5911. <https://doi.org/10.1128/jvi.00254-08>
- Grueso, E., 2006. Modificaciones en dominios funcionales de la cápsida del Parvovirus MVM con péptidos heterólogos: efectos en oncotropismo y ciclo viral. Tesis doctoral. Universidad Autónoma de Madrid.
- Grueso, E., Sánchez-Martínez, C., Calvo-López, T., de Miguel, F.J., Blanco-Menéndez, N., Fernandez-Estevez, M., Elizalde, M., Sanchez, J., Kourani, O., Martin, D., Tato, A., Guerra, M., Andrés, G., Almendral, J.M., 2019. Antiangiogenic Vascular Endothelial Growth Factor-Blocking Peptides Displayed on the Capsid of an Infectious Oncolytic Parvovirus: Assembly and Immune Interactions. *J Virol* 93: e:00798-19. <https://doi.org/10.1128/jvi.00798-19>
- Guetta, E., Graziani, Y., Tal, J., 1986. Suppression of Ehrlich Ascites Tumors in Mice by Minute Virus of Mice. *J Natl Cancer Inst* 76, 1177–1180.
- Gurda, B.L., DiMattia, M.A., Miller, E.B., Bennett, A., McKenna, R., Weichert, W.S., Nelson, C.D., Chen, W-J., Muzyczka, N., Olson, N.H., Sinkovits, R.S., Chiorini, J.A., Zolotutkhin, S., Kozyreva, O.G., Samulski, R.J., Baker, T.S., Parrish, C.R., Agbandje-McKenna, M., 2013. Capsid Antibodies to Different Adeno-Associated Virus Serotypes Bind Common Regions. *J Virol* 87, 9111–9124. <https://doi.org/10.1128/JVI.00622-13>
- Hafenstein, S., Bowman, V.D., Sun, T., Nelson, C.D., Palermo, L.M., Chipman, P.R., Battisti, A.J., Parrish, C.R., Rossmann, M.G., 2009. Structural Comparison of Different Antibodies Interacting with Parvovirus Capsids. *J Virol* 83, 5556–5566. <https://doi.org/10.1128/JVI.02532-08>
- Halder, S., Cotmore, S., Heimburg-Molinaro, J., Smith, D.F., Cummings, R.D., Chen, X., Trollope, A.J., North, S.J., Haslam, S.M., Dell, A., Tattersall, P., McKenna, R., Agbandje-McKenna, M., 2014. Profiling of Glycan Receptors for Minute Virus of Mice in Permissive Cell Lines towards Understanding the Mechanism of Cell Recognition. *PLoS ONE* 9, e86909. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0086909>
- Hernando, E., Llamas-Saiz, A.L., Foces-Foces, C., McKenna, R., Portman, I., Agbandje-McKenna, M., Almendral, J.M., 2000. Biochemical and Physical Characterization of Parvovirus Minute Virus of Mice Virus-like Particles. *Virology* 267, 299–309. <https://doi.org/10.1006/viro.1999.0123>
- Huang, T., Wang, H., Chen, N.G., Frentzen, A., Minev, B., Szalay, A.A., 2015. Expression of Anti-VEGF Antibody Together with Anti-EGFR or Anti-FAP Enhances Tumor Regression as a Result of Vaccinia Virotherapy. *Mol Ther Oncolytics* 2, 15003. <https://doi.org/10.1038/mto.2015.3>
- Itatani, Y., Kawada, K., Takamasa Y., Sakai, Y., 2018. Resistance to Anti-Angiogenic Therapy in Cancer-Alterations to Anti-VEGF Pathway. *Int J Mol Sci* 19: 1232. <https://doi.org/10.3390/ijms19041232>
- Jackson, C.B., Richard, A.S., Ojha, A., Conkright, K.A., Trimarchi, J.M., Bailey, C.C., Alpert, M.D.,

- Kay, M.A., Farzan, M., Choe, H., 2020. AAV Vectors Engineered to Target Insulin Receptor Greatly Enhance Intramuscular Gene Delivery. *Mol Ther Methods Clin Dev* 19, 496–506. <https://doi.org/10.1016/j.omtm.2020.11.004>
- Johnson, D.B., Puzanov, I., Kelley, M.C., 2015. Talimogene Laherparepvec (T-VEC) for the Treatment of Advanced Melanoma. *Immunotherapy* 7, 611–619. <https://doi.org/10.2217/imt.15.35>
- Jongeneel, C.V., Sahli, R., McMaster, G.K., Hirt, B., 1986. A Precise Map of Splice Junctions in the MRNAs of Minute Virus of Mice, an Autonomous Parvovirus. *J Virol* 59, 564–573. <https://doi.org/10.1128/jvi.59.3.564-573.1986>
- Kailasan, S., Agbandje-McKenna, M., Parrish, C.R., 2015. Parvovirus Family Conundrum: What Makes a Killer? *Annu Rev Virol* 2, 425–450. <https://doi.org/10.1146/annurev-virology-100114-055150>
- Kang, Y., Shin, H., Yoo, J.Y., Kim, J., Kim, J., Yun, C., 2008. Novel Cancer Antiangiotherapy Using the VEGF Promoter-Targeted Artificial Zinc-Finger Protein and Oncolytic Adenovirus. *Mol Ther* 16, 1033–1040. <https://doi.org/10.1038/mt.2008.63>
- Kaufmann, B., Lopez-Bueno, A., Mateu, M.G., Chipman, P.R., Nelson, C.D., Parrish, C.R., Almendral, J.M., Rossmann, M.G., 2007. Minute Virus of Mice , a Parvovirus , in Complex with the Fab Fragment of a Neutralizing Monoclonal Antibody. *J Virol* 81, 9851–9858. <https://doi.org/10.1128/JVI.00775-07>
- Klimczak, R.R., Koerber, J.T., Dalkara, D., Flannery, J.G., Schaffer, D.V., 2009. A Novel Adeno-Associated Viral Variant for Efficient and Selective Intravitreal Transduction of Rat Müller Cells. *PLoS ONE* 4, e7467. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0007467>
- Koerber, J.T., Jang, J.H., Schaffer, D.V., 2008. DNA Shuffling of Adeno-Associated Virus Yields Functionally Diverse Viral Progeny. *Mol Ther* 16, 1703–1709. <http://dx.doi.org/10.1038/mt.2008.167>
- Kontou, M., Govindasamy, L., Nam, H.J., Bryant, N., Llamas-Saiz, A.L., Foces-Foces, C., Hernando, E., Rubio, M.P., McKenna, R., Almendral, J.M., Agbandje-McKenna, M., 2005. Structural Determinants of Tissue Tropism and In Vivo Pathogenicity for the Parvovirus Minute Virus of Mice. *J Virol* 79, 10931–10943. <https://doi.org/10.1128/JVI.79.17.10931-10943.2005>
- Körbelin, J., Sieber, T., Michelfelder, S., Lunding, L., Spies, E., Hunger, A., Alawi, M., Rapti, K., Inderbirken, D., Müller, O.J., Pasqualini, R., Arap, W., Kleinschmidt, J.A., Trepel, M., 2016. Pulmonary Targeting of Adeno-Associated Viral Vectors by Next-Generation Sequencing-Guided Screening of Random Capsid Displayed Peptide Libraries. *Mol Ther* 24, 1050–1061. <https://doi.org/10.1038/mt.2016.62>
- Lam, J.T., Kanerva, A., Bauerschmitz, G.J., Suzuki, K., Yamamoto, M., Bhoola, S.M., Liu, B., Wang, M., Barnes, M.N., Alvarez, R.D., Siegal, G.P., Curiel, D.T., Hemminki, A., 2004. Inter-Patient Variation in Efficacy of Five Oncolytic Adenovirus Candidates for Ovarian Cancer Therapy. *J Gene Med* 6, 1333–1342. <https://doi.org/10.1002/jgm.635>
- Lang, S.I., Giese, N.A., Rommelaere, J., Dinsart, C., Cornelis, J.J., 2006. Humoral Immune Responses against Minute Virus of Mice Vectors. *J Gene Med* 8, 1141–1150. <https://doi.org/10.1002/jgm.940>
- Langeveld, J.P., Casal, J.I., Vela, C., Dalsgaard, K., Smale, S.H., Puijk, W.C., Meloen, R.H., 1993. B-Cell Epitopes of Canine Parvovirus: Distribution on the Primary Structure and Exposure on the

- Viral Surface. *J Virol* 67, 765–772.
- Lavie, M., Struyf, S., Stroh-Dege, A., Rommelaere, J., Van Damme, J., Dinsart, C., 2013. Capacity of Wild-Type and Chemokine-Armed Parvovirus H-1PV for Inhibiting Neo-Angiogenesis. *Virology* 447: 221–232. <https://doi.org/10.1016/j.virol.2013.09.019>
- Linser, P., Bruning, H., Armentrout, R.W., 1977. Specific Binding Sites for a Parvovirus, Minute Virus of Mice, on Cultured Mouse Cells. *J Virol* 24, 211–221. <https://doi.org/10.1128/jvi.24.1.211-221.1977>
- Liu, T., Hwang, T., Park, B., Bell, J., Kirn, D.H., 2008. The Targeted Oncolytic Poxvirus JX-594 Demonstrates Antitumoral, Antivasular, and Anti-HBV Activities in Patients with Hepatocellular Carcinoma. *Mol Ther* 16, 1637–1642. <https://doi.org/10.1038/mt.2008.143>
- Liu, Y., Zhang, X., Yang, Y., 2020. Genetic Engineering of AAV Capsid Gene for Gene Therapy Application. *Curr Gene Ther* 20, 321–332. <https://doi.org/10.2174/1566523220066200930105521>
- Liu, Z., Yang, Y., Zhang, X., Wang, H., Xu, W., Wang, H., Xiao, F., Bai, Z., Yao, H., Ma, X., Jin, L., Wu, C., Seth, P., Zhang, Z., Wang, L., 2017. An Oncolytic Adenovirus Encoding Decorin and GM-CSF Inhibits Tumor Growth in a Colorectal Tumor Model by Targeting Pro-Tumorigenic Signals and via Immune Activation. *Hum Gene Ther* 28, 667–680. <https://doi.org/10.1089/hum.2017.033>
- Llamas-Saiz, A., Agbandje-McKenna, M., Wikoff, W.R., Bratton, J., Tattersall, P., Rossmann, M.G., 1997. Structure Determination of Minute Virus of Mice. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* 53, 93–102. <https://doi.org/10.1107/s0907444996010566>
- Lombardo, E., Ramírez, J.C., Agbandje-McKenna, M., Almendral, J.M., 2000. A Beta-Stranded Motif Drives Capsid Protein Oligomers of the Parvovirus Minute Virus of Mice into the Nucleus for Viral Assembly. *J Virol* 74, 3804–3814. <https://doi.org/10.1128/JVI.74.8.3804-3814.2000>
- Lombardo, E., Ramírez, J.C., Garcia, J., Almendral, J.M., 2002. Complementary Roles of Multiple Nuclear Targeting Signals in the Capsid Proteins of the Parvovirus Minute Virus of Mice during Assembly and Onset of Infection. *J Virol* 76, 7049–7059. <https://doi.org/10.1128/JVI.76.14.7049-7059.2002>
- López-Bueno, A., Mateu, M.G., Almendral, J.M., 2003. High Mutant Frequency in Populations of a DNA Virus Allows Evasion from Antibody Therapy in an Immunodeficient Host. *J Virol* 77, 2701–2708. <https://doi.org/10.1128/JVI.77.4.2701-2708.2003>
- López-Bueno, A., Valle, N., Gallego, J.M., Perez, J., Almendral, J.M., 2004. Enhanced Cytoplasmic Sequestration of the Nuclear Export Receptor CRM1 by NS2 Mutations Developed in the Host Regulates Parvovirus Fitness. *J Virol* 78, 10674–10684. <https://doi.org/10.1128/JVI.78.19.10674-10684.2004>
- Lopez-Bueno, A., Rubio, M.P., Bryant, N., McKenna, R., Agbandje-McKenna, M., Almendral, J.M., 2006. Host-Selected Amino Acid Changes at the Sialic Acid Binding Pocket of the Parvovirus Capsid Modulate Cell Binding Affinity and Determine Virulence. *J Virol* 80, 1563–1573. <https://doi.org/10.1128/JVI.80.3.1563-1573.2006>
- Lopez-Bueno, A., Segovia, J.C., Bueren, J.A., O’Sullivan, M.G., Wang, F., Tattersall, P., Almendral, J.M., 2008. Evolution to Pathogenicity of the Parvovirus Minute Virus of Mice in Immunodeficient

- Mice Involves Genetic Heterogeneity at the Capsid Domain That Determines Tropism. *J Virol* 82, 1195–1203. <https://doi.org/10.1128/JVI.01692-07>
- Louis Jeune, V., Joergensen, J.A., Hajjar, R.J., Weber, T., 2013. Pre-Existing Anti-Adeno-Associated Virus Antibodies as a Challenge in AAV Gene Therapy. *Hum Gene Ther Methods* 24, 59–67. <https://doi.org/10.1089/hgtb.2012.243>
- Lu, P.J., Zhou, X.Z., Shen, M., Lu, K.P., 1999. Function of WW Domains as Phosphoserine- or Phosphothreonine-Binding Modules. *Science* 283, 1325–1328. <https://doi.org/10.1126/science.283.5406.1325>
- MacLachlan, T.K., Lukason, M., Collins, M., Munger, R., Isenberger, E., Rogers, C., Malatos, S., DuFresne, E., Morris, J., Calcedo, R., Veres, G., Scaria, A., Andrews, L., Wadsworth, S., 2011. Preclinical Safety Evaluation of AAV2-SFLT01 a Gene Therapy for Age-Related Macular Degeneration. *Mol Ther* 19, 326–34. <http://dx.doi.org/10.1038/mt.2010.258>
- Maguire, C.A., Gianni, D., Meijer, D.H., Shaket, L.A., Wakimoto, H., Rabkin, S.D., Gao, G., Sena-Esteves, M., 2010. Directed Evolution of Adeno-Associated Virus for Glioma Cell Transduction. *J Neurooncol* 96, 337–347. <https://doi.org/10.1007/s11060-009-9972-7>
- Mao, Y., Pei, N., Chen, X., Chen, H., Yan, R., Bai, N., Li, A., Li, J., Zhang, Y., Du, H., Chen, B., Summers, C., Wang, X., Wang, S., Li, H., 2018. Angiotensin 1-7 Overexpression Mediated by a Capsid-Optimized AAV8 Vector Leads to Significant Growth Inhibition of Hepatocellular Carcinoma *in Vivo*. *Int J Biol Sci* 14, 57–68. <https://doi.org/10.7150/ijbs.22235>
- Marchini, A., Bonifati, S., Scott, E.M., Angelova, A.L., Rommelaere, J., 2015. Oncolytic Parvoviruses: From Basic Virology to Clinical Applications. *Virology* 12, 1–16. <https://doi.org/10.1186/s12985-014-0223-y>
- Marino, N., Illingworth, S., Kodialbail, P., Patel, A., Calderon, H., Lear, R., Fisher, K.D., Champion, B.R., Brown, A.C.N., 2017. Development of a Versatile Oncolytic Virus Platform for Local Intra-Tumoural Expression of Therapeutic Transgenes. *PLoS ONE* 12, e0177810. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0177810>
- Maroto, B., Ramirez, J.C., Almendral, J.M., 2000. Phosphorylation Status of the Parvovirus Minute Virus of Mice Particle: Mapping and Biological Relevance of the Major Phosphorylation Sites. *J Virol* 74, 10892–10902. <https://doi.org/10.1128/JVI.74.23.10892-10902.2000>
- Matsumoto, K., Ema, M., 2014. Roles of VEGF-A Signaling in Development, Regeneration, and Tumors. *J Biochem* 156, 1–10. <https://doi.org/10.1093/jb/mvu031>
- Maxwell, I.H., Spitzer, A.L., Maxwell, F., Pintel, D.J., 1995. The Capsid Determinant of Fibrotropism for the MVMp Strain of Minute Virus of Mice Functions via VP2 and Not VP1. *J Virol* 69, 5829–5832. <https://doi.org/10.1128/jvi.69.9.5829-5832.1995>
- Merchinsky, M.J., Tattersall, P.J., Leary, J.J., Cotmore, S.F., Gardiner, E.M., Ward, D.C., 1983. Construction of an Infectious Molecular Clone of the Autonomous Parvovirus Minute Virus of Mice. *J Virol* 47, 227–232.
- Miller, C.L., Pintel, D.J., 2002. Interaction between Parvovirus NS2 Protein and Nuclear Export Factor Crm1 Is Important for Viral Egress from the Nucleus of Murine Cells. *J Virol* 76, 3257–3266. <https://doi.org/10.1128/jvi.76.7.3257-3266.2002>

- Moon, C.Y., Choi, J., Kasala, D., Jung, A., Kim, S.W., Yun, C., 2015. Dual Tumor Targeting with PH-Sensitive and Bioreducible Polymer-Complexed Oncolytic Adenovirus. *Biomaterials* 41, 53–68. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2014.11.021>
- Muik, A., Reul, J., Friedel, T., Muth, A., Hartmann, K.P., Schneider, I.C., Münch, R.C., Buchholz, C.J., 2017. Covalent Coupling of High-Affinity Ligands to the Surface of Viral Vector Particles by Protein Trans-Splicing Mediates Cell Type-Specific Gene Transfer. *Biomaterials* 144, 84–94. <http://dx.doi.org/10.1016/j.biomaterials.2017.07.032>
- Münch, R.C., Janicki, H., Völker, I., Rasbach, A., Hallek, M., Büning, H., Buchholz, C.J., 2013. Displaying High-Affinity Ligands on Adeno-Associated Viral Vectors Enables Tumor Cell-Specific and Safe Gene Transfer. *Mol Ther* 21, 109–118. <https://doi.org/10.1038/mt.2012.186>
- Naeger, L.K., Cater, J., Pintel, D.J., 1990. The Small Nonstructural Protein (NS2) of the Parvovirus Minute Virus of Mice Is Required for Efficient DNA Replication and Infectious Virus Production in a Cell-Type-Specific Manner. *J Virol* 64, 6166–6175. <https://doi.org/10.1128/jvi.64.12.6166-6175.1990>
- Naeger, L.K., Salomé, N., Pintel, D.J., 1993. NS2 Is Required for Efficient Translation of Viral mRNA in Minute Virus of Mice-Infected Murine Cells. *J Virol* 67, 1034–1043. <https://doi.org/10.1128/jvi.67.2.1034-1043.1993>
- Nam, H., Gurda-Whitaker, B., Gan, W.Y., Ilaria, S., McKenna, R., Mehta, P., Alvarez, R.A., Adbandje-McKenna, M., 2006. Identification of the Sialic Acid Structures Recognized by Minute Virus of Mice and the Role of Binding Affinity in Virulence Adaptation. *J Biol Chem* 281, 25670–25677. <https://doi.org/10.1074/jbc.m604421200>
- Paglino, J.C., Ozduman, K., van den Pol, A.N., 2012. LuIII Parvovirus Selectively and Efficiently Targets, Replicates in, and Kills Human Glioma Cells. *J Virol* 86, 7280–7291. <https://doi.org/10.1128/jvi.00227-12>
- Pan, Q., Chantry, Y., Liang, W.C., Stawicki, S., Mak, J., Rathore, N., Tong, R.K., Kowalski, J., Yee, S.F., Pacheco, G., Ross, S., Cheng, Z., Couter, J.L., Plowman, G., Peale, F., Koch, A.W., Wu, Y., Bagri, A., Tessier-Lavigne, M., Watts, R.L., 2007. Blocking Neuropilin-1 Function Has an Additive Effect with Anti-VEGF to Inhibit Tumor Growth. *Cancer Cell* 11, 53–67. <https://doi.org/10.1016/j.ccr.2006.10.018>
- Patil, S.S., Gentshev, I., Adelfinger, M., Donat, U., Hess, M., Weibel, S., Nolte, I., Frentzen, A., Szalay, A.A., 2012. Virotherapy of Canine Tumors with Oncolytic Vaccinia Virus GLV-1h109 Expressing an Anti-VEGF Single-Chain Antibody. *PLoS ONE* 7, e47472. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0047472>
- Pénzes, J.J., Söderlund-Venermo, M., Canuti, M., Eis-Hübinger, A.M., Hughes, J., Cotmore, S.F., Harrach, B., 2020. Reorganizing the Family Parvoviridae: A Revised Taxonomy Independent of the Canonical Approach Based on Host Association. *Arch Virol* 165, 2133–2146. <https://doi.org/10.1007/s00705-020-04632-4>
- Pillet, S., Annan, Z., Fichelson, S., Morinet, F., 2003. Identification of a Nonconventional Motif Necessary for the Nuclear Import of the Human Parvovirus B19 Major Capsid Protein (VP2). *Virology* 306, 25–32. [https://doi.org/10.1016/S0042-6822\(02\)00047-8](https://doi.org/10.1016/S0042-6822(02)00047-8)

Bibliografía

- Plate, K.H., Breier, G., Weich, H.A., Risau, W., 1992. Vascular Endothelial Growth Factor Is a Potential Tumour Angiogenesis Factor in Human Gliomas in Vivo. *Nature* 359, 845–848. <https://doi.org/10.1038/359845a0>
- Ramírez, J.C., Santaren, J.F., Almendral, J.M., 1995. Transcriptional Inhibition of the Parvovirus Minute Virus of Mice by Constitutive Expression of an Antisense RNA Targeted against the NS-1 Transactivator Protein. *Virology* 206, 57–68. [https://doi.org/10.1016/S0042-6822\(95\)80019-0](https://doi.org/10.1016/S0042-6822(95)80019-0).
- Ramírez, J.C., Fairén, A., Almendral, J.M., 1996. Parvovirus Minute Virus of Mice Strain i Multiplication and Pathogenesis in the Newborn Mouse Brain Are Restricted to Proliferative Areas and to Migratory Cerebellar Young Neurons. *J Virol* 70, 8109–8116. <https://doi.org/10.1128/jvi.70.11.8109-8116.1996>
- Reguera, J., Carreira, A., Riobos, L., Almendral, J.M., Mateu, M.G., 2004. Role of Interfacial Amino Acid Residues in Assembly, Stability, and Conformation of a Spherical Virus Capsid. *Proc Natl Acad Sci USA* 101, 2724–2729. <https://doi.org/10.1073/pnas.0307748101>
- Rhim, J.H., Tosato, G., 2007. Targeting the Tumor Vasculature to Improve the Efficacy of Oncolytic Virus Therapy. *J Natl Cancer Inst* 99, 1739–1741. <https://doi.org/10.1093/jnci/djm234>
- Riobos, L., Reguera, J., Mateu, M.G., Almendral, J.M., 2006. Nuclear Transport of Trimeric Assembly Intermediates Exerts a Morphogenetic Control on the Icosahedral Parvovirus Capsid. *J Mol Biol* 357, 1026–1038. <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2006.01.019>
- Riobos, L., Valle, N., Hernando, E., Maroto, B., Kann, M., Almendral, J.M., 2010. Viral Oncolysis That Targets Raf-1 Signaling Control of Nuclear Transport. *J Virol* 84, 2090–2099. <https://doi.org/10.1128/JVI.01550-09>
- Rommelaere, J., Geletneky, K., Angelova, A.L., Daeffler, L., Dinsart, C., Kiprianova, I., Schlehofer, J.R., Raykov, Z., 2010. Oncolytic Parvoviruses as Cancer Therapeutics. *Cytokine Growth Factor Rev* 21, 185–195. <https://doi.org/10.1016/j.cytogfr.2010.02.011>
- Ros, C., Bayat, N., Wolfisberg, R., Almendral, J.M., 2017. Protoparvovirus Cell Entry. *Viruses* 9, 313. <https://doi.org/10.3390/v9110313>
- Rubio, M.P., Guerra, S., Almendral, J.M., 2001. Genome Replication and Postencapsidation Functions Mapping to the Nonstructural Gene Restrict the Host Range of a Murine Parvovirus in Human Cells. *J Virol* 75, 11573–11582. <https://doi.org/10.1128/jvi.75.23.11573-11582.2001>
- Rubio, M.P., Lopez-Bueno, A., Almendral, J.M., 2005. Virulent Variants Emerging in Mice Infected with the Apathogenic Prototype Strain of the Parvovirus Minute Virus of Mice Exhibit a Capsid with Low Avidity for a Primary Receptor. *J Virol* 79, 11280–11290. <https://doi.org/10.1128/JVI.79.17.11280-11290.2005>
- Saito, Y., Sunamura, M., Motoi, F., Abe, H., Egawa, S., Duda, D.G., Hoshida, T., Fukuyama, S., Hamada, H., Matsuno, S., 2006. Oncolytic Replication-Competent Adenovirus Suppresses Tumor Angiogenesis through Preserved E1A Region. *Cancer Gene Ther* 13, 242–252. <https://doi.org/10.1038/sj.cgt.7700902>
- Sallach, J., Pasquale, G.D., Larcher, F., Niehoff, N., Rübsam, M., Huber, A., Chiorini, J., Almarza, D., Eming, S.A., Ulus, H., Nishimura, S., Hacker, U.T., Hallek, M., Niessen, C.M., Büning, H., 2014. Tropism-Modified AAV Vectors Overcome Barriers to Successful Cutaneous Therapy. *Mol Ther*

- 22, 929–939. <http://dx.doi.org/10.1038/mt.2014.14>
- Sánchez-Martínez, C., Grueso, E., Carroll, M., Rommelaere, J., Almendral, J.M., 2012. Essential Role of the Unordered VP2 N-Terminal Domain of the Parvovirus MVM Capsid in Nuclear Assembly and Endosomal Enlargement of the Virion Fivefold Channel for Cell Entry. *Virology* 432, 45–56. <https://doi.org/10.1016/j.virol.2012.05.025>
- Santarén, J.F., Ramírez, J.C., Almendral, J.M., 1993. Protein Species of the Parvovirus Minute Virus of Mice Strain MVMp: Involvement of Phosphorylated VP-2 Subtypes in Viral Morphogenesis. *J Virol* 67, 5126–5138.
- Santiago-Ortiz, J., Schaffer, D.V., 2016. Adeno-Associated Virus (AAV) Vectors in Cancer Gene Therapy. *J Control Release* 240, 287–301. <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2016.01.001>
- Segovia, J.C., Real, A., Bueren, J.A., Almendral, J.M., 1991. In Vitro Myelosuppressive Effects of the Parvovirus Minute Virus of Mice (MVMi) on Hematopoietic Stem and Committed Progenitor Cells. *Blood* 77, 980–988.
- Segovia, J.C., Guenechea, G., Gallego, J.M., Almendral, J.M., Bueren, J.A., 2003. Parvovirus Infection Suppresses Long-Term Repopulating Hematopoietic Stem Cells. *J Virol* 77, 8495–8503. <https://doi.org/10.1128/jvi.77.15.8495-8503.2003>
- Segovia, J.C., Gallego, J.M., Bueren, J.A., Almendral, J.M., 1999. Severe Leukopenia and Dysregulated Erythropoiesis in SCID Mice Persistently Infected with the Parvovirus Minute Virus of Mice. *J Virol* 73, 1774–1784. <https://doi.org/10.1128/jvi.73.3.1774-1784.1999>
- Shein, H.M., Enders, J.F., Levinthal, J.D., 1962. Transformation Induced by Simian Virus 40 in Human Renal Cell Cultures, *II. Cell-Virus Relationships. *Microbiology* 48, 1350–1357. <https://doi.org/10.1073/pnas.48.8.1350>
- Shi, W., Arnold, G.S., Bartlett, J.S., 2001. Insertional Mutagenesis of the Adeno-Associated Virus Type 2 (AAV2) Capsid Gene and Generation of AAV2 Vectors Targeted to Alternative Cell-Surface Receptors. *Hum Gene Ther* 12, 1697–1711. <https://doi.org/10.1089/104303401750476212>
- Shi, W., Bartlett, J.S., 2003. RGD Inclusion in VP3 Provides Adeno-Associated Virus Type 2 (AAV2)-Based Vectors with a Heparan Sulfate-Independent Cell Entry Mechanism. *Mol Ther* 7, 515–525. [http://dx.doi.org/10.1016/S1525-0016\(03\)00042-X](http://dx.doi.org/10.1016/S1525-0016(03)00042-X)
- Shi, X., Fang, G., Shi, W., Bartlett, J.S., 2006. Insertional Mutagenesis at Positions 520 and 584 of Adeno-Associated Virus Type 2 (AAV2) Capsid Gene and Generation of AAV2 Vectors with Eliminated Heparin-Binding Ability and Introduced Novel Tropism. *Hum Gene Ther* 17, 353–361. <https://doi.org/10.1089/hum.2006.17.353>
- Siegl, G., 1984. Biology and Pathogenicity of Autonomous Parvoviruses, in: Berns, K.I. (Ed.), *The Parvoviruses*. Springer US, Boston, MA, pp. 297-362.
- Smith, N.R., Wedge, S.R., Pommier, A., Barry, S.T., 2014. Mechanisms That Influence Tumour Response to VEGF-Pathway Inhibitors. *Biochem Soc Trans* 42, 1601–1607. <https://doi.org/10.1042/bst20140261>
- Spalholz, B.A., Tattersall, P., 1983. Interaction of Minute Virus of Mice with Differentiated Cells: Strain-Dependent Target Cell Specificity Is Mediated by Intracellular Factors. *J Virol* 46, 937–943. <https://doi.org/10.1128/jvi.46.3.937-943.1983>

Bibliografía

- Starzec, Starzec, A., Vassy, R., Martin, A., Lecouvey, M., Di Benedetto, M., Crépin, M., Perret, G.Y., 2006. Antiangiogenic and Antitumor Activities of Peptide Inhibiting the Vascular Endothelial Growth Factor Binding to Neuropilin-1. *Life Sci* 79, 2370–2381. <https://doi.org/10.1016/j.lfs.2006.08.005>
- Starzec, A., Ladam, P., Vassy, R., Badache, S., Bouchemal, N., Navaza, A., Du Penhoat, C.H., Perret, G.Y., 2007. Structure-Function Analysis of the Antiangiogenic ATWLPPR Peptide Inhibiting VEGF165 Binding to Neuropilin-1 and Molecular Dynamics Simulations of the ATWLPPR/Neuropilin-1 Complex. *Peptides* 28, 2397–2402. <https://doi.org/10.1016/j.peptides.2007.09.013>
- Tabebordbar, M., Lagerborg, K.A., Stanton, A., King, E.M., Ye, S., Tellez, L., Krunnufusz, A., Tavakoli, S., Widrick, J.J., Messemer, K.A., Troiano, E.C., Moghadaszadeh, B., Peacker, B.L., Leacock, K.A., Horwitz, N., Beggs, A.H., Wagers, A.J., Sabeti, P.C., 2021. Directed Evolution of a Family of AAV Capsid Variants Enabling Potent Muscle-Directed Gene Delivery across Species. *Cell* 184, 4919–4938. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2021.08.028>
- Tattersall, P., Bratton, J., 1983. Reciprocal Productive and Restrictive Virus-Cell Interactions of Immunosuppressive and Prototype Strains of Minute Virus of Mice. *J Virol* 46, 944–955. <https://doi.org/10.1128/jvi.46.3.944-955.1983>
- Thorne, S.H., Tam, B.Y.Y., Kirn, D.H., Contag, C.H., Kuo, C.J., 2006. Selective Intratumoral Amplification of an Antiangiogenic Vector by an Oncolytic Virus Produces Enhanced Antivascular and Anti-Tumor Efficacy. *Mol Ther* 13, 938–946. <https://doi.org/10.1016/j.ymthe.2005.12.010>
- Tomita, Y., Kurozumi, K., Yoo, J.Y., Fujii, K., Ichikawa, T., Matsumoto, Y., Uneda, A., Hattori, Y., Shimizu, T., Otani, Y., Oka, T., Kaur, B., Date, I., 2019. Oncolytic Herpes Virus Armed with Vasculostatin in Combination with Bevacizumab Abrogates Glioma Invasion via the CCN1 and AKT Signaling Pathways. *Mol Cancer Ther* 18, 1418–1429. <https://doi.org/10.1158/1535-7163.mct-18-0799>
- Toro Bejarano, M., Merchan, J., 2015. Targeting Tumor Vasculature through Oncolytic Virotherapy: Recent Advances. *Oncolytic Virother* 4, 169–181. <https://doi.org/10.2147/ov.s66045>
- Tsao, J., Chapman, M.S., Agbandje, M., Keller, W., Smith, K., Wu, H., Luo, M., Smith, T.J., Rossmann, M.G., Compans, R.W., Parrish, C.R., 1991. The Three-Dimensional Structure of Canine Parvovirus and Its Functional Implications. *Science* 251, 1456–1464. <https://doi.org/10.1126/science.2006420>
- Tse, L.V., Klinc, K.A., Madigan, V.J., Castellanos Rivera, R.M., Wells, L.F., Havlik, L.P., Smith, J.K., Agbandje-McKenna, M., Asokan, A., 2017. Structure-Guided Evolution of Antigenically Distinct Adeno-Associated Virus Variants for Immune Evasion. *Proc Natl Acad Sci USA* 114, E4812–E4821. <https://doi.org/10.1073/pnas.1704766114>
- Tseng, Y.S., Agbandje-McKenna, M., 2014. Mapping the AAV Capsid Host Antibody Response toward the Development of Second Generation Gene Delivery Vectors. *Front Immunol* 5, 1–11. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2014.00009>
- Tullis, G.E., Burger, L.R., Pintel, D.J., 1993. The Minor Capsid Protein VP1 of the Autonomous Parvovirus Minute Virus of Mice Is Dispensable for Encapsulation of Progeny Single-Stranded

- DNA but Is Required for Infectivity. *J Virol* 67, 131–141.
- Valle, N., Riolobos, L., Almendral, J.M., 2005. Synthesis, Post-Translational Modification and Trafficking of the Parvovirus Structural Polypeptides. In *Parvoviruses*, 291–304.
- Varadi, K., Michelfelder, S., Korff, T., Hecker, M., Trepel, M., Katus, H.A., Kleinschmidt, J.A., Müller, O.J., 2012. Novel Random Peptide Libraries Displayed on AAV Serotype 9 for Selection of Endothelial Cell-Directed Gene Transfer Vectors. *Gene Ther* 19, 800–809. <https://doi.org/10.1038/gt.2011.143>
- Ventoso, I., Berlanga, J.J., Almendral, J.M., 2010. Translation Control by Protein Kinase R Restricts Minute Virus of Mice Infection: Role in Parvovirus Oncolysis. *J Virol* 84, 5043–5051. <https://doi.org/10.1128/jvi.02188-09>
- Vicari, D., Foy, K.C., Liotta, E.M., Kaumaya, P.T.P., 2011. Engineered Conformation-Dependent VEGF Peptide Mimics Are Effective in Inhibiting VEGF Signaling Pathways. *J Biol Chem* 286, 13612–13625. <https://doi.org/10.1074/jbc.m110.216812>
- Xie, Q., Bu, W., Bhatia, S., Hare, J., Somasundaram, T., Azzi, A., Chapman, M.S., 2002. The Atomic Structure of Adeno-Associated Virus (AAV-2), a Vector for Human Gene Therapy. *Proc Natl Acad Sci USA* 99, 10405–10410. <https://doi.org/10.1073/pnas.162250899>
- Yang, Q., Mamounas, M., Yu, G., Kennedy, S., Leaker, B., Merson, J., Wong-Staal, F., Yu, M., Barber, J.R., 1998. Development of Novel Cell Surface CD34-Targeted Recombinant Adenoassociated Virus Vectors for Gene Therapy. *Hum Gene Ther* 9, 1929–1937. <https://doi.org/10.1089/hum.1998.9.13-1929>
- Yang, Y.S., Xie, J., Wang, D., Kim, J.M., Tai, P.W.L., Gravallesse, E., Gao, G., Shim, J.H., 2019. Bone-Targeting AAV-Mediated Silencing of Schnurri-3 Prevents Bone Loss in Osteoporosis. *Nat Commun* 10, 2958. <http://dx.doi.org/10.1038/s41467-019-10809-6>
- Zádori, Z., Szelei, J., Lacoste, M.C., Li, Y., Gariépy, S., Raymond, P., Allaire, M., Nabi, I.R., Tijssen, P., 2001. A Viral Phospholipase A2 Is Required for Parvovirus Infectivity. *Dev Cell* 1, 291–302. [https://doi.org/10.1016/s1534-5807\(01\)00031-4](https://doi.org/10.1016/s1534-5807(01)00031-4)
- Zheng, J., Pei, D., Sun, F., Liu, X., Mao, L., Zhang, B., Wen, R., Xu, W., Shi, Z., Liu, J., Li, W., 2009. Potent Antitumor Efficacy of Interleukin-18 Delivered by Conditionally Replicative Adenovirus Vector in Renal Cell Carcinoma-Bearing Nude Mice via Inhibition of Angiogenesis. *Cancer Biol Ther* 8, 599–606. <https://doi.org/10.4161/cbt.8.7.7914>

ANEXOS

1. **Artículo publicado:** “Antiangiogenic Vascular Endothelial Growth Factor-Blocking Peptides Displayed on the Capsid of an Infectious Oncolytic Parvovirus: Assembly and Immune Interactions”. Grueso et al. (2019) J. Virol 93, e00798-19.127
2. **Artículo en preparación:** “Re-Targeting Parvovirus to the Tumor Vasculature by Replacing Residues of Capsid Functional Domains with VEGF-blocking Peptides”.....145



Antiangiogenic Vascular Endothelial Growth Factor-Blocking Peptides Displayed on the Capsid of an Infectious Oncolytic Parvovirus: Assembly and Immune Interactions

Esther Grueso,^{*,*} Cristina Sánchez-Martínez,^{*,*} Tania Calvo-López,^a Fernando J. de Miguel,^{*,*} Noelia Blanco-Menéndez,^{*,*} Marian Fernandez-Estevez,^{*,*} Maria Elizalde,^{*,*} Jorge Sanchez,^a Omar Kourani,^{*,*} Diana Martin,^{*,*} Aroa Tato,^a Milagros Guerra,^a Germán Andrés,^a José M. Almendral^a

^aCentro de Biología Molecular Severo Ochoa (CSIC-UAM), Madrid, Spain

ABSTRACT As many tumor cells synthesize vascular endothelial growth factors (VEGF) that promote neo-vascularization and metastasis, frontline cancer therapies often administer anti-VEGF (-VEGF) antibodies. To target the oncolytic parvovirus minute virus of mice (MVM) to the tumor vasculature, we studied the functional tolerance, evasion of neutralization, and induction of -VEGF antibodies of chimeric viruses in which the footprint of a neutralizing monoclonal antibody within the 3-fold capsid spike was replaced by VEGF-blocking peptides: P6L (PQPRPL) and A7R (ATWLPPR). Both peptides allowed viral genome replication and nuclear translocation of chimeric capsid subunits. MVM-P6L efficiently propagated in culture, exposing the heterologous peptide on the capsid surface, and evaded neutralization by the anti-spike monoclonal antibody. In contrast, MVM-A7R yielded low infectious titers and was poorly recognized by an -A7R monoclonal antibody. MVM-A7R showed a deficient assembly pattern, suggesting that A7R impaired a transitional configuration that the subunits must undergo in the 3-fold axis to close up the capsid shell. The MVM-A7R chimeric virus consistently evolved in culture into a mutant carrying the P6Q amino acid substitution within the A7R sequence, which restored normal capsid assembly and infectivity. Consistent with this finding, anti-native VEGF antibodies were induced in mice by a single injection of MVM-A7R empty capsids, but not by MVM-A7R virions. This fundamental study provides insights to endow an infectious parvovirus with immune antineovascularization and evasion capacities by replacing an antibody footprint in the capsid 3-fold axis with VEGF-blocking peptides, and it also illustrates the evolutionary capacity of single-stranded DNA (ssDNA) viruses to overcome engineered capsid structural restrictions.

IMPORTANCE Targeting the VEGF signaling required for neovascularization by vaccination with chimeric capsids of oncolytic viruses may boost therapy for solid tumors. VEGF-blocking peptides (VEbp) engineered in the capsid 3-fold axis endowed the infectious parvovirus MVM with the ability to induce -VEGF antibodies without adjuvant and to evade neutralization by MVM-specific antibodies. However, these properties may be compromised by structural restraints that the capsid imposes on the peptide configuration and by misassembly caused by the heterologous peptides. Significantly, chimeric MVM-VEbp resolved the structural restrictions by selecting mutations within the engineered peptides that restored efficient capsid assembly. These data show the promise of antineovascularization vaccines using chimeric VEbp-icosahedral capsids of oncolytic viruses but also raise safety concerns regarding the genetic stability of manipulated infectious parvoviruses in cancer and gene therapies.

KEYWORDS VEGF, VEGF peptides, antibody footprint, capsid assembly, capsid engineering, immune evasion, infectious chimeras, parvovirus, tumor vascularization, virus evolution

Citation Grueso E, Sánchez-Martínez C, Calvo-López T, de Miguel FJ, Blanco-Menéndez N, Fernandez-Estevez M, Elizalde M, Sanchez J, Kourani O, Martin D, Tato A, Guerra M, Andrés G, Almendral JM. 2019. Antiangiogenic vascular endothelial growth factor-blocking peptides displayed on the capsid of an infectious oncolytic parvovirus: assembly and immune interactions. *J Virol* 93:e00798-19. <https://doi.org/10.1128/JVI.00798-19>.

Editor Joanna L. Shisler, University of Illinois at Urbana Champaign

Copyright © 2019 American Society for Microbiology. All Rights Reserved.

Address correspondence to José M. Almendral, jmalendral@cbm.csic.es.

* Present address: Esther Grueso and Cristina Sánchez-Martínez, Biosciences Research Institute. School of Experimental Sciences, Universidad Francisco de Vitoria, Madrid, Spain; Fernando J. de Miguel, Yale Cancer Center, Yale University School of Medicine, New Haven, Connecticut, USA; Noelia Blanco-Menéndez, Instituto de Investigación Biomédica de a Coruña (CHUAC-UJC), a Coruña, Spain; Marian Fernandez-Estevez, Cambridge Institute for Medical Research, Cambridge University, Cambridge, United Kingdom; Maria Elizalde, Center for Applied Medical Research (CIMA), University of Navarra, Pamplona, Spain; Omar Kourani, Department of Cancer Biology, Instituto de Investigaciones Biomédicas Alberto Sols (CSIC-UAM), Madrid, Spain; Diana Martin, Animal Health Research Center (CISA-INIA), Madrid, Spain.

E.G., C.S.-M., and T.C.-L. contributed equally to this work.

Received 10 May 2019

Accepted 10 July 2019

Accepted manuscript posted online 17 July 2019

Published 12 September 2019

Many tumor cells synthesize vascular endothelial growth factors (VEGF) that promote the formation of new blood vessels (angiogenesis) that favor tumor growth

and metastasis (1, 2). VEGF signals mainly through two receptor tyrosine kinases, VEGF-R1 (Flt-1) and VEGF-R2 (Flk-1/KDR), the latter being the primary mediator of VEGF angiogenic activity, in association with neuropilin-1 (3). Therefore, many cancer therapies target VEGF signaling, which may not only inhibit tumor growth but also reverse the immunosuppressive state in cancer patients by indirect mechanisms (4, 5). One successful therapy is administration of the anti-VEGF (-VEGF) neutralizing monoclonal antibody (MAb) bevacizumab (Avastin) (6), which showed clinical benefit in different tumor types (7, 8). Methods to improve this passive immunotherapy, such as the induction of polyclonal -VEGF neutralizing antibodies by vaccination against peptides covering the bevacizumab binding site (9), are strategies under investigation. It should be mentioned, though, that the biosafety of prolonged anti-VEGF immune therapy is controversial, as systemic delivery of anti-VEGF antibodies in mice produced adverse effects in healthy vasculature (10), in contrast to the minor adverse effects observed in patients subjected to a long-term VEGF-based cancer therapeutic vaccine (11). Other peptides that also inhibit VEGF signaling and induce antiangiogenic and tumor growth inhibition (12) may reinforce this area of research. Among peptides with the capacity to block VEGF functions, the heptapeptide A7R (also named V1 [ATWLPPR]) was identified by screening a phage library against an -VEGF antibody (13). A7R binds neuropilin-1, inhibiting VEGF binding to the VEGF-R2 receptor, and it inhibited vascular density and tumor growth (14). The peptide P6L (PQPRPL) was selected to specifically bind VEGF-R1 and neuropilin-1 after biopanning a phage display library (15). It is noteworthy that combined therapies that target VEGF-R1 and neuropilin-1 have additive effects in reducing tumor growth (16).

Current nonconventional cancer therapies also include oncolytic viruses used in multiple ongoing experimental approaches and clinical trials (17, 18). Some members of the *Parvoviridae* (19) are among the viruses being developed as oncolytic agents on the basis of their preference for infection of human transformed cells and their lytic capacity (20-22). Adeno-associated virus (AAV) and parvovirus H-1 (H-1PV) are undergoing clinical trials in cancer patients (22, 23), and minute virus of mice (MVM), a mouse pathogen (24, 25) that lacks pathogenicity for humans, is also being tested as an oncolytic agent because of its acute lytic effects on diverse human tumor types (26-30) and anticancer effect in animal models (31). Parvoviruses and other oncolytic viruses targeting the tumor vasculature are being developed through a variety of approaches pursuing indirect antitumor effects. For example, VEGF/VEGF-R2 signaling sensitizes endothelial cells to oncolytic vaccinia virus (32), many adenoviruses have been armed to suppress VEGF and other angiogenic factors (33, 34), and the bevacizumab antibody has been expressed from AAV vectors to suppress ovarian cancer growth and metastatic lung tumors (35, 36). However, to our knowledge, no infectious oncolytic virus has been genetically engineered to structurally display antiangiogenic VEGF-blocking peptides (VEbp). Such chimeric viruses, in addition to their inherent direct antitumor effects, could induce anti-VEGF immune responses with improved clinical benefits over current passive therapies.

The parvovirus capsid is a powerful antigen-presenting vehicle that elicits long-lasting humoral and cellular immunity without adjuvant against inserted heterologous peptides (37-40). However, the tight structural organization of small icosahedral particles imposes severe engineering restrictions when the functions of the inserted peptides, as well as virus infectivity, must both be preserved. The parvovirus capsid has been extensively manipulated with heterologous peptides for multiple immune applications and retargeting purposes (41-47), although the causes of common failures of infectivity were generally not mechanistically determined. Insertions of heterologous peptides even at the most exposed loops may hamper virus-like-particle (VLP) assembly (48), but prominent loops of empty capsids and VLPs may be tolerant of the insertion of certain peptides (38, 49). However, empty capsids and VLPs markedly differed from mature DNA-filled parvovirus in both composition and posttranslational modifications

of the coat protein subunits (VPs) (50). Moreover, they do not recapitulate the multiple functions that the infectious capsid undertakes during the virus cycle, such as the cellular compartment of assembly (28) or intracellular trafficking to the nucleus for genome delivery (51).

In a previous study, we showed that insertion of the antiangiogenic A7R peptide within the flexible VPs' N-terminal domains yielded assembled noninfectious DNA-filled MVM particles, due to the failure of a VP2-Nt cleavage required to initiate infection (52). These findings prompted us to search for another capsid domain with different functional requirements and to assess substitutions of viral peptides instead of insertions into the MVM structure. The atomic structure of the MVM capsid (53, 54) showed the VP1 (83-kDa) and VP2 (64-kDa) protein subunits adopting a conformation in the

α -barrel constituting eight β -sheets, with large loops interposed between the sheets, which configure the topology of the surface (Fig. 1A). As in related parvoviruses (55-57), four loops from the three subunits intertwined at the 3-fold-symmetry axis to form the spike of the capsid (22 Å long and 70 Å wide). The structure of the MVM capsid in complex with the B7-MAb neutralizing monoclonal antibody determined at 7-Å resolution by cryo-electron microscopy (cryo-EM) (58) identified a conformational epitope on the spike engaging the three symmetry-related subunits. Some of the residues involved in the MVM-B7 contacts were mutated in B7-MAb-resistant viruses isolated in mice (59). These B7-MAb-resistant mutants maintained tropism and pathogenicity, consistent with the MVM tropism determinants that mapped to a depression on the capsid 2-fold axis (60-62). These studies identified the spike as an immunodominant domain potentially suitable for the manipulation of the MVM capsid without compromising infectivity.

In the present work, the neutralizing B7-MAb epitope on the MVM capsid surface was replaced with two antiangiogenic VEbp, the VEGF mimic A7R and P6L peptides. This strategy aimed to produce chimeric parvoviruses to serve as (i) platforms for VEbp to develop antineovascularization vaccines inducing polyclonal antibodies and lasting immunity that may improve current passive tumor immunotherapy regimes, (ii) oncolytic infectious agents to combat the α -VEGF antibody resistance observed in some tumors, and (iii) infectious antigen vehicles capable of evading preexisting humoral immunity. Functions of the chimeric VEbp capsids were analyzed during the virus infection cycle and evasion of neutralizing antibodies, and the inserted peptides were studied for their surface exposure, immunogenicity, and genetic stability in prolonged cultures.

RESULTS

Chimeric MVM-VEbp engineered at the spike of the capsid. We rationally designed MVM chimeras by genetic engineering within the footprint of a neutralizing antibody resolved by cryo-electron microscopy on the 3-fold axis of the capsid (58). This epitope is formed by three intertwined subunits (54, 55) that tolerated the emergence of virus escape mutants (59). The 433-NPIGTKN-439 residues (VP2 numbering) in the three symmetry-related protein subunits that compose loop 4, are exposed on the capsid surface (Fig. 1A), and delineate the protruding B7-MAb neutralizing epitope (Fig. 1B) were replaced by either of two antiangiogenic VEbp (A7R and P6L) (Fig. 1C). The resulting chimeric viruses (MVM-A7R and MVM-P6L) were constructed in an infectious molecular clone of the prototype (p) strain of MVM (MVMp) (63), and plasmids and virus stocks were confirmed by sequencing (see Materials and Methods).

Impact of heterologous VEbp on the MVM life cycle. To analyze the effects of VEbp on the viral infectious cycle, we first studied the capacities of the MVM-VEbp chimeras for productive infection in culture. Chimeric (pMVM-P6L and pMVM-A7R) and wild-type (wt) (pMVMp) genomic clones were transfected into permissive NB324K transformed fibroblasts, and the cultures were monitored for VP expression over time (Fig. 2A). The wt transfections produced virus that rapidly spread in culture, yielding close to 100% VP-positive (VP⁺) cells and patent cytopathic effect (CPE) by 120 h posttransfection (hpt). pMVM-P6L yielded similar albeit slower kinetics of cell infection

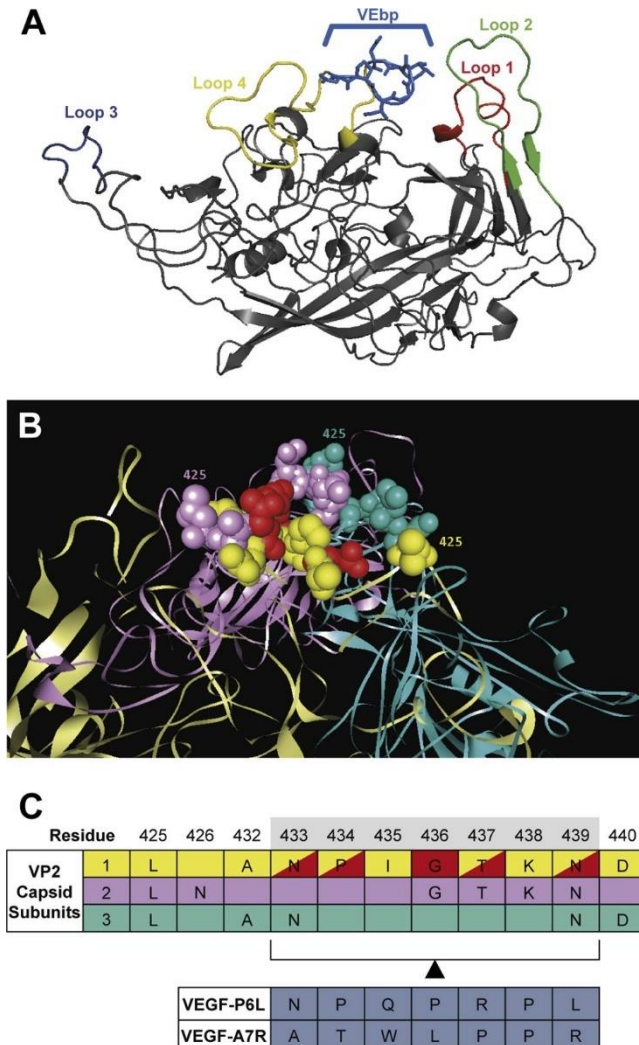


FIG 1 Engineering the MVM capsid spike with VEbp. (A) Structure of the VP2 subunit assembled in the MVMp capsid (54) showing loop 1 (red), loop 2 (green), loop 3 (dark blue), and loop 4 (yellow). The peptide within loop 4 replaced by the heterologous VEbp in chimeric viruses is shown in light blue and stick representation. (B) Configuration of the loop 4 residues replaced by VEbp. The color code is as follows: balls, residues establishing contacts with the B7-MAb (58); yellow, light blue, and pink, residues of each of the three subunits forming the spike of the capsid; and red, residues selected in MAR mutants (59) (illustrated in only one subunit). (C) Distribution of the amino acid residues in loop 4 of the three VP2 protein subunits forming the spike. Residues replaced by the VEbp are indicated (bottom). The color code is as in panel B, except that residues labeled in yellow and red are those in contact with the B7-MAb, as well as selected in MAR mutants. The software used was PyMol. The Protein Data Bank (PDB) accession number for VP2 of MVMp is 1z14 (see Movie S1 in the supplemental material).

and CPE. Although pMVM-A7R cultures showed comparable percentages of VP cells at 48 hpt, no significant progression of the infection was demonstrated even at late times posttransfection.

We next investigated whether the low yield of MVM-A7R could be due to an A7R sequence-mediated impairment of viral DNA replication. For this, low-molecular-weight DNA was isolated from NB324K cells transfected by the viral genomic clones and subjected to Southern blot analysis. As shown in Fig. 2B, wt and chimeric plasmids induced correct synthesis of viral intermediate replicative forms (RF-I and RF-II). Interestingly, the single-stranded DNA (ssDNA) species associated with genome packaging into maturing viral capsids (64) were resolved only in pMVMp- and pMVM-P6L-transfected cells. This experiment demonstrated that A7R impairs the yield of packaged viral genomes.

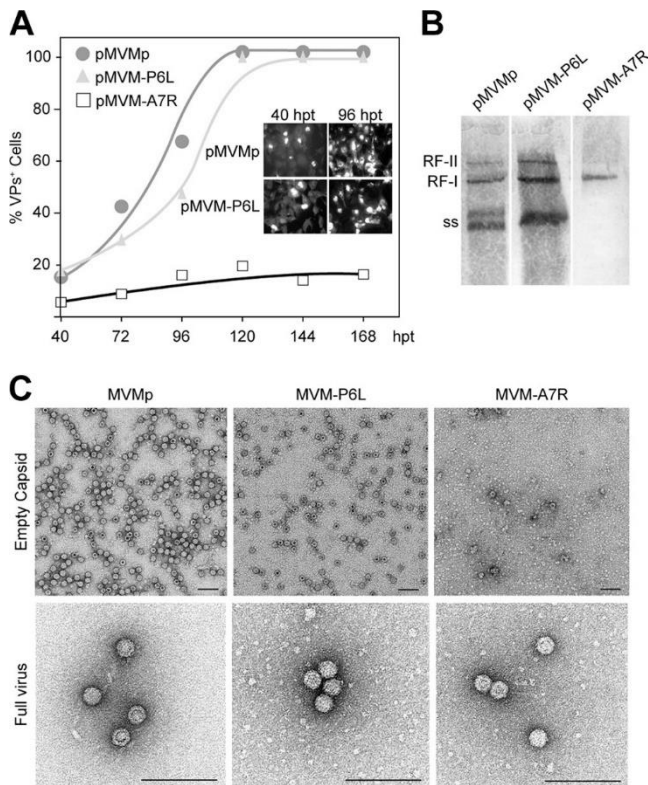


FIG 2 VEGP differentially impact the MVM infection cycle. (A) Progression of MVMp, MVM-P6L, and MVM-A7R infections in culture. Shown are the percentages of NB324K cells expressing capsid proteins (VPs) at the indicated times posttransfection by the genomic plasmids. (Inset) VP immunostaining for the wt and the pMVM-P6L plasmid. Shown is a representative experiment from three independent assays with similar outcomes. (B) MVMp, MVM-P6L, and MVM-A7R genome replication. Shown is Southern blot hybridization to low-molecular-weight DNA obtained at 48 hpt from 10^6 NB324K cells transfected by the indicated genomic plasmids. RF-I and RF-II, replicative intermediates; ss, single-stranded virus genomes. (C) EM analysis of purified empty and DNA-filled wt and VEGP chimeric viral particles. The images show representative fields from several purifications. The MVM-A7R full virus image is from a highly concentrated preparation. Scale bars, 100 nm.

The production of viral particles was determined after large-scale transfection (52) by each of the three infectious clones at 48 hpt, with yields of purified empty and DNA-filled capsids from equivalent numbers of transfected cells inspected by EM (Fig. 2C). Similar amounts of empty capsids and DNA-filled viruses were obtained from the pMVMp and pMVM-P6L transfections, with particles showing the characteristic parvoviral 25-nm diameter and morphology at high resolution. In the pMVM-A7R transfections, however, the recovery of viral particles was much lower, and fractions from CsCl gradients corresponding to the density of protein showed some MVM-A7R empty capsids and large amounts of nonparticulate aggregates. DNA-filled viruses were not detected in preliminary EM inspection of the fractions corresponding to ssDNA virus density, but they could be demonstrated at normal size and morphology upon concentration by centrifugation (Fig. 2C, bottom right).

Chimeric MVM displays VEGP on the capsid surface. The exposure and configuration of the heterologous VEGP were studied by their capacity to interact with specific antibodies in cells and *in vitro*. First, NB324K cells transfected with the wt and chimeric genomic clones were analyzed for the expression and subcellular localization of the VP viral structural proteins (Fig. 3A). Immunofluorescence (IF) staining with -MVM capsid polyclonal antiserum showed the chimeric proteins accumulated in the nucleus at an efficiency comparable to that of the wt, indicating that the VEGP did not impair VP nuclear translocation. B7-MAb labeled the MVMp nuclear capsid formation as described previously (65), whereas it failed to recognize chimeric viral particles, consistent with

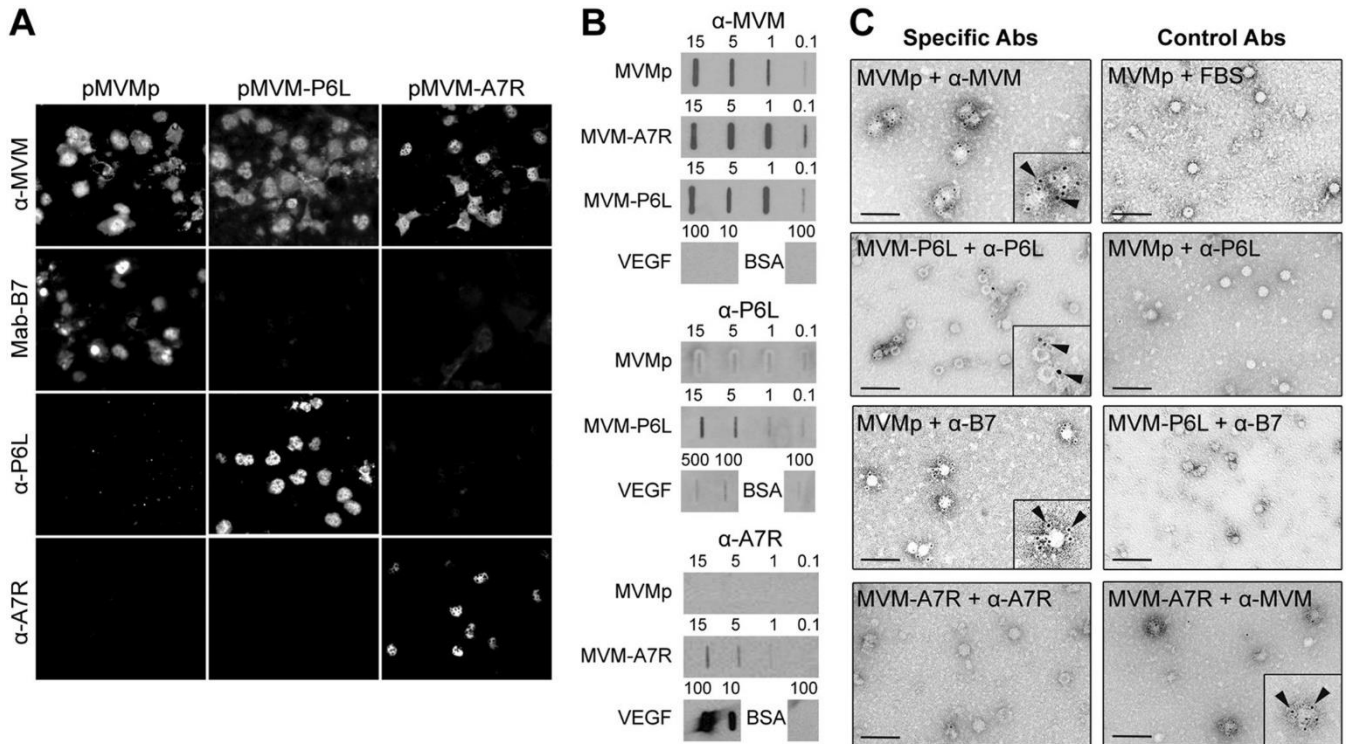


FIG 3 Antibody recognition of the VEbp displayed on chimeric capsid surfaces. (A) Confocal IF of wt and chimeric VP protein expression and subcellular localization in transfected cells. Representative stainings with the indicated -MVM capsid, anti-3-fold wt epitope (B7-MAb), and -VEbp specific antibodies are shown. The pMVM-A7R images showing -MVM and -A7R staining show the same field of cells. (B) Slot-blot analysis of VEbp surface exposure on purified viral particles. Serial dilutions of purified virions or marker proteins were applied to nitrocellulose membranes in PBS and incubated with the indicated antibodies. Virion and protein amounts (in nanograms) are shown. (C) Immunogold labeling of chimeric MVM virions bearing VEbp. Shown are representative EM fields of purified virions stained with the indicated antibodies, followed by the addition of protein A or anti-mouse IgG conjugated to 5-nm gold particles. The antibody dilutions used were 1:5 for -MVM capsid, 1:25 for B7-MAb, and 1:2 for the -P6L and -A7R peptide antibodies. (Insets) The arrowheads indicate gold particles decorating viral particles. Scale bars, 100 nm.

the genetic replacement of the B7 epitope (Fig. 1). The -P6L polyclonal antibody recognized the VP subunits in the pMVM-P6L transfections without significant signals in the wt- and VPs-A7R-expressing cells. The recognition of VP-A7R subunits by the -A7R monoclonal antibody was significant and also specific, although the staining was detected in only a few VP-expressing cells using a high antibody concentration (Fig. 3A, bottom right).

We next addressed the exposure of the VEbp on the surfaces of purified DNA-filled virions. It should be emphasized that wt and MVM-P6L virions could be purified in sufficient amounts from cultures at 4 dpt after large-scale transfection, but obtaining similar amounts of chimeric MVM-A7R virions for the analyses required subculturing of transfected cells for 2 weeks. Virions bound to nitrocellulose filters under native conditions were first analyzed (Fig. 3B), showing that wt and both chimeric viruses maintained conformational epitopes allowing similar recognition by the anti-MVM capsid polyclonal antiserum. Both VEbp were specifically detected by the corresponding antibodies, though the signal for detection of A7R was weaker. Native VEGF was barely recognized by the -P6L antibody but intensively by the -A7R antibody, in agreement with the distinct methodologies used to select these VEbp peptides (13, 15). To avoid misinterpretation of peptide exposure due to putative distortion of the viral capsids bound to filters, the specificity of the antibody recognition was supported by immunogold labeling of virions bound to grids (Fig. 3C). When visualized at the EM level, the MVMp particles were profusely decorated with gold by the -MVM and B7-MAb antibodies, while the latter antibody consistently failed to recognize chimeric virions. Importantly, MVM-P6L virions were again specifically recognized by the -P6L antibody, although the ratio of gold particles per virion was low. In contrast, the -A7R

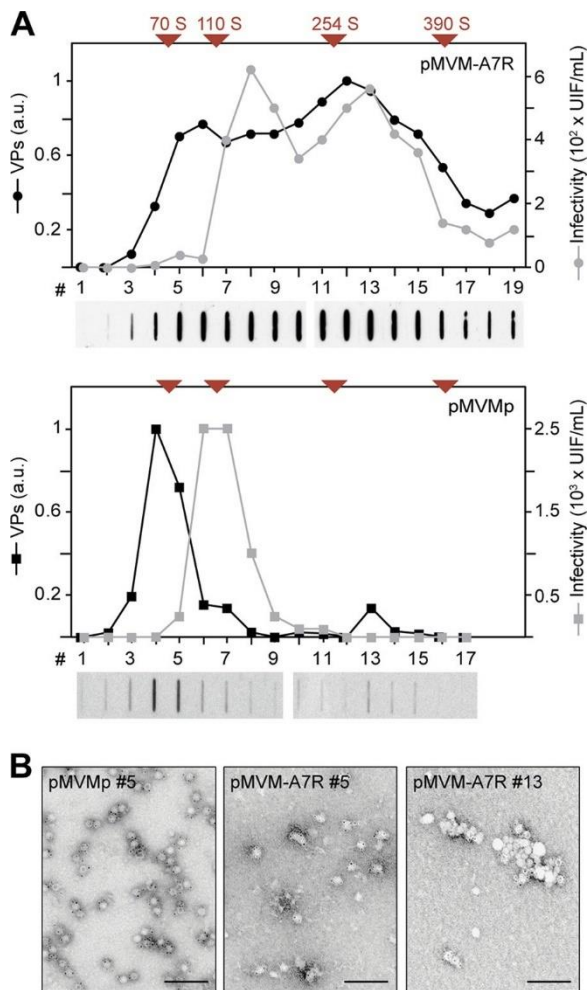


FIG 4 Assembly pattern of the chimeric virus MVM-A7R. Extracts from NB3245K cells transfected by the indicated genomic plasmids harvested at 48 hpt were sedimented for 1 h at 4°C through 5% to 30% sucrose gradients to resolve normal MVM particles and supraviral assemblies. (A) Slot-blot analysis of the distribution of the capsid proteins (VPs) in fractions loaded in PBS with 0.1% SDS and developed with the -VP antibody. a.u., arbitrary units of densitometry. Samples were also studied for the distribution of infectivity (UIF). Shown are the average percentages of VP-expressing cells (-VP antibody staining at 24 h postinoculation) scored under a microscope from two independent replicates. (B) EM analysis of the presence of viral particles and MVM assemblies in selected fractions from the sucrose gradients subjected to immunogold staining. The primary antibody was rabbit -MVM capsid at 1:5 dilution. Scale bars, 100 nm.

antibody failed to decorate the MVM-A7R virions in multiple trials, even though the -MVM antibody strongly decorated them (Fig. 3C, bottom). In summary, these analyses confirmed the efficient exposure and immune recognition of the P6L peptide displayed on the infectious MVM virion and also suggested that the subunits intertwining at the 3-fold axis of the capsid impose structural distortion(s) on the peptide A7R.

VEbp may impair MVM capsid assembly. We next investigated whether the restrictions imposed by the A7R peptide on virus genome packaging (Fig. 2B) and recovery of viral particles from transfections (Fig. 2C) could originate from a structural disturbance created in the MVM capsid. For this, the MVMp and MVM-A7R capsid assembly patterns were compared by sedimentation analysis through sucrose gradients of extracts from cells transfected by the respective genomic infectious plasmids (Fig. 4A) under conditions that resolved MVM particles and assembly intermediates. MVMp assembly showed a normal pattern of VP distribution in fractions corresponding to the sedimentation of empty capsids (70S), which accumulated at an S value slightly

lower than that of the bulk infectivity corresponding to the DNA-filled virus (110S) (Fig. 4A, bottom). In sharp contrast, the chimeric VP subunits and infectivity resulting from two independent pMVM-A7R transfections were consistently found distributed across a wide range of S values (Fig. 4A, top), with significant accumulation at fractions of normal viral size, but also at fractions of the 254S marker corresponding to molecular entities much larger than MVM particles. This unexpected pattern was carefully inspected for the presence of MVM-A7R large supraviral particles and assemblies by EM immunogold staining with an anti-MVM antibody. As illustrated in Fig. 4B, samples from distinct S values across the MVM-A7R gradients showed no evidence of large capsids or regular assemblies. Instead, the gold particles were confined in all samples to viral particles of normal size embedded within protein aggregates or misassembled VPs. This analysis demonstrated that A7R impairs the ordered MVM nuclear capsid assembly.

Antibody evasion and immunogenicity of MVM-VEbp chimeric viruses. We next analyzed whether the VEbp exposed on the capsid surface altered neutralization of the MVM chimeric viruses by specific antibodies (Fig. 5A). Infectious (UIF) MVMp and chimeric viruses were efficiently neutralized by the -MVM polyclonal antiserum at high concentration, whereas the B7-MAb blocked only infection by the wt, as described previously (58, 59), failing to neutralize the chimeric viruses even at a high concentration. The capacity of MVM-P6L to absolutely evade B7-MAb neutralization was further confirmed by a PFU assay (Fig. 5B and C, left bars). Further PFU tests demonstrated that the MVM-P6L chimera indeed partially evaded neutralization by the -MVM polyclonal antiserum when used at lower concentration (Fig. 5C, right bars). While the -A7R antibody did not show neutralization capacity even against different stocks of MVM-A7R (Fig. 5A), the -P6L polyclonal antibody at high concentration specifically decreased MVM-P6L infectivity. These results demonstrated the possibility of engineering an antibody footprint at the prominent 3-fold axis of the capsid with heterologous peptides that remain exposed on the surface and confer evasion of neutralization by -MVM antibodies.

Another major aim of this research was the induction of -VEGF antibodies using the MVM-VEbp as antigens. The -P6L antibody weakly recognized native VEGF immobilized in filters (Fig. 3B, middle), consistent with the absence of immune interaction in the method originally used to select peptide P6L (15). We therefore addressed this issue with the MVM-A7R chimera, because peptide A7R was selected by the -A7R MAb that efficiently binds (Fig. 3B, bottom) and neutralizes (13) native VEGF. To assay the immunogenicity of the VEbp presented in the context of the MVM capsid, we intraperitoneally (i.p.) injected mice with purified empty MVM-A7R capsids without adjuvant, and the specificity of the antisera was tested by dot blotting (Fig. 5D). Mice were sensitized to MVM capsid epitopes, as their sera efficiently recognized the wt and MVM-A7R capsids. Importantly, empty MVM-A7R capsids induced specific anti-VEGF antibodies, reacting with native VEGF immobilized on filters (Fig. 5D). This result supports replacement of 3-fold residues by VEbp as a successful strategy to mount an -VEGF immune response with chimeric MVM capsids. Unexpectedly, repeated injections of equivalent amounts of infectious chimeric MVM-A7R virions did not induce significant levels of anti-VEGF antibodies (data not shown).

Genetic stability of chimeric MVM-VEbp. The capacity of MVM-A7R purified from passaged cultures to evade -A7R antibody recognition (Fig. 3C and 5A), in spite of the specific -A7R nuclear staining in pMVM-A7R-transfected cells (Fig. 3A) and the failure of MVM-A7R virions to induce -VEGF antibodies in mice, prompted us to address the genetic stability of the chimeric capsids. The nucleotide sequences of loop 4, which harbors the residues replaced by the VEbp, and the other three loops (1 to 3) of the VPs forming the spike (Fig. 6A and B) were determined in populations of wt and chimeric viruses after 2 weeks of growth in culture, as well as in molecular and infectious biological clones. The sequences of loops 1 to 3 in populations harvested from transfection and isolated plaques showed no changes in respect to the reference sequence in any of the wt or chimeric viruses, indicating that manipulation of loop 4

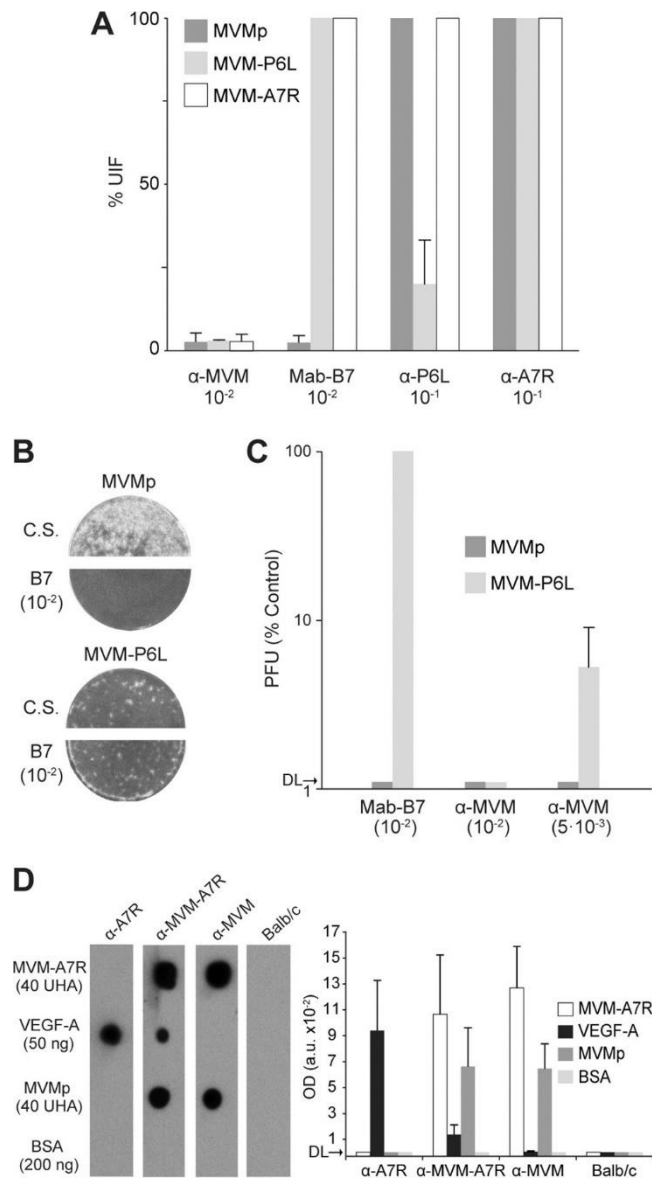


FIG 5 Evasion of antibody neutralization and immunogenicity of MVM-VEbp chimeras. (A) Neutralization assay of MVM-VEbp chimeras by specific antibodies. The viruses were incubated for 30 min in PBS with the indicated antibodies and inoculated onto NB324K cells, and their infectivity was determined by the number of VP-expressing cells (UIF) scored at 20 h postinoculation. The values are means and standard errors from five determinations. (B) MVM-P6L plaque-forming capacity evades B7-MAb neutralization. Shown are MVMp neutralization by B7-MAb in NB324K cells (top) and the lack of effect on chimeric MVM-P6L plaque-forming capacity at the same antibody dilution (bottom). C.S., control serum. (C) Comparison of neutralization of MVMp and MVM-P6L by the B7-MAb and -MVM antibodies at the specified dilutions. Note the partial resistance of MVM-P6L to neutralization by the -MVM antiserum. DL, detection limit of the assay. (D) Chimeric MVM-A7R capsids elicit anti-VEGF antibodies in BALB/c mice. (Left) Representative results of the antibody recognition (1:200 dilution) of the indicated amounts of each sample applied to nitrocellulose filters in PBS and developed by a chemiluminescence method. (Right) Antibody titers. Signals in the films were quantitated as for Fig. 4A. The values are means and standard errors from four independent immunizations (n 3 mice per sample). OD, optical density; UHA, hemagglutination units.

by the VEbp did not select for any genetic modification in the rest of the loops forming the spike. The sequence of loop 4 in the MVM-P6L populations, and several biological clones (PFU), remained identical to that of the original genomic clone, with no evidence of heterogeneity (Fig. 6C). However, the sequences of loop 4 in samples from the MVM-A7R populations reflected genetic heterogeneity at nucleotide position 4016 in

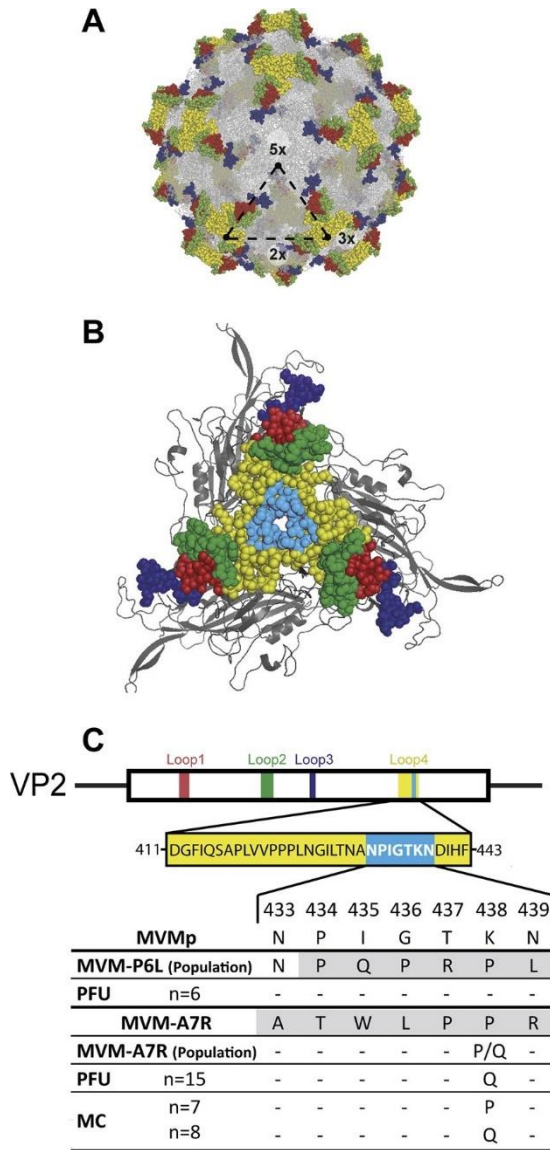


FIG 6 Genetic stability of the MVM-VEbp chimeras. (A) Icosahedral structure of the MVMp capsid (PyMol; PDB accession number 1z14) shown in stick representation (gray). The spike is shown as spheres colored at loop 1 (red), loop 2 (green), loop 3 (dark blue), and loop 4 (yellow). The locations of the 5-fold (5), 3-fold (3), and 2-fold (2) symmetry axes are highlighted. (B) Enlarged top view of the topology of the loops forming the MVM spike. Substituted residues within loop 4 are shown in blue. (C) Genetic analysis of chimeric viruses grown in culture. The nucleotide sequences of the four loops were studied in the chimeric viruses grown in culture. The VP2 amino acid sequence forming loop 4 of the MVMp capsid is shown, and the residues replaced by the VEbp are highlighted. The average sequences of the MVM-P6L and MVM-A7R populations were obtained after 2 weeks in culture. The sequence of the initial MVM-A7R chimeric virus is outlined. PFU, virus biological clone; MC, molecular clone.

the chromatograms. A cytosine-to-adenosine mutation was observed (Fig. 6C), corresponding to a change of the second proline of the A7R peptide into glutamine (P6Q). This single mutation was apparent in several molecular clones constructed from the MVM-A7R population (see Materials and Methods): seven clones maintained adenosine, but eight showed cytosine at this position, supporting the heterogeneity observed in the population (Fig. 6C). Of note, the genetic analysis performed with biological clones (PFU) isolated from the MVM-A7R population consistently showed the P6Q change in all cases (Fig. 6C). Thus, peptide A7R in loop 4 of the spike impaired MVM plaque-forming capacity, but the single P6Q amino acid change selected in culture restored efficient plaque formation and fitness of the chimeric MVM-A7R-P6Q in culture.

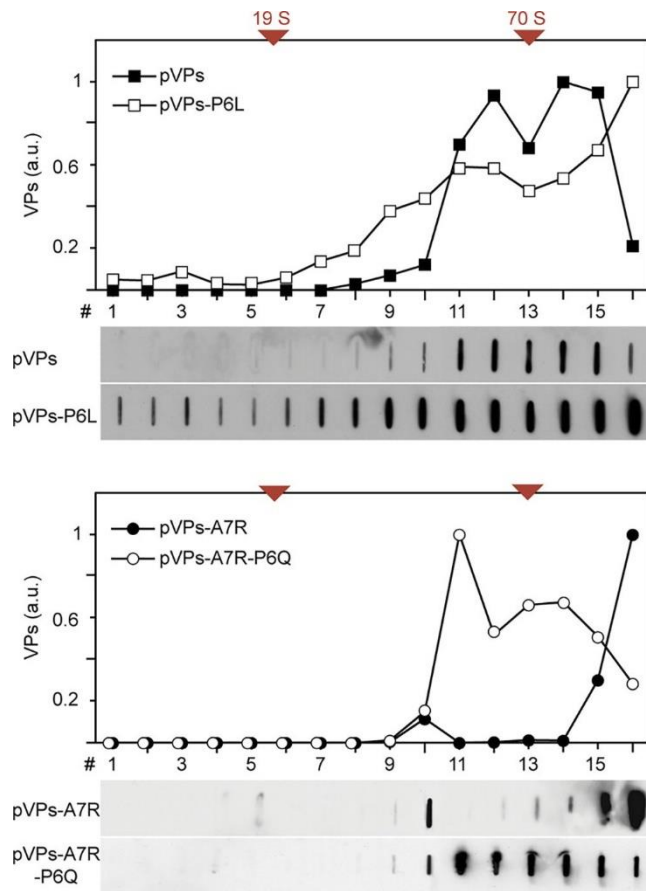


FIG 7 Pattern of chimeric empty-capsid assembly. Sedimentation analysis of VP assemblies expressed at 48 hpt in NB324K cells transfected by the specified plasmids. Samples were resolved by parallel centrifugation at 4°C through 5% to 30% sucrose gradients, and the amounts of VPs in the fractions were analyzed by slot-blot analysis as described in the legend to Fig. 4. (Top) Wt and chimeric P6L structural protein assemblies. (Bottom) Chimeric A7R and A7R-P6Q structural protein assemblies. The S values of the sedimentation markers (19S, thyroglobulin; 70S, empty MVM capsids) are indicated at the top. a.u., arbitrary units of densitometry.

Finally, we studied whether the restored plaque-forming capacity of the MVM-A7R-P6Q mutant was related to rescue of capsid assembly functions. For this, we compared the profiles of velocity sedimentation across sucrose gradients of the wt, chimeric, and A7R-P6Q capsid proteins in cells transfected by the respective VP-expressing plasmids (Fig. 7). The wt and chimeric VP-P6L proteins efficiently assembled in capsids with normal sedimentation values (Fig. 7, top). While chimeric VP-A7R proteins formed some capsids of normal size, they mostly were found in large assemblies or aggregates sedimenting at the bottom of the gradients (Fig. 7, bottom). This pattern was consistent with that observed after transfection of the genomic clones (Fig. 4), supporting the notion that the assembly defect of the MVM-A7R chimera is inherent to its VP subunits. Remarkably, the assembly pattern of the VP-A7R-P6Q subunits was similar to that of the wt, confirming P6Q as a compensatory mutation that provides a structural solution to the defective capsid assembly exhibited by MVM-A7R.

DISCUSSION

Two parallel areas of current clinical significance in cancer therapy, -VEGF antibodies and oncolytic viruses, were combined in the present work aimed at endowing the infectious parvovirus MVM with potential antineovascularization properties. Infectious oncolytic parvoviruses displaying VEbp on the capsid surface could eventually be used as therapeutic vaccines to induce anti-VEGF neutralizing antibodies and thereby

inhibit neovascularization and tumor growth. The MVM capsid was engineered with two high-affinity VEbp within a major immunogenic epitope, and chimeric viruses were tested for infectivity, peptide exposure on assembled capsids, evasion of neutralization, induction of anti-VEGF antibodies, and genetic stability.

An infectious MVM-VEbp chimera. Replacement of viral sequences in loop 4 of the 3-fold axis capsid spike with the P6L peptide allowed propagation of the resulting chimeric virus in culture (Fig. 2A and C), consistent with its efficient genome replication and packaging (Fig. 2B), and a pattern of capsid assembly similar to that of wt MVM (Fig. 7, top). Preservation of major intracellular and extracellular capsid functions in the MVM-P6L life cycle was compatible with surface exposure of peptide P6L, allowing significant recognition (Fig. 3B and C) and neutralization (Fig. 5A) by the -P6L polyclonal antibody. The configuration(s) of peptide P6L on the spike would favor novel contacts among the residues of the three VP subunits forming the spike in a structural solution that was genetically stable upon extensive viral passages in culture (Fig. 6). These data support loop 4 as a suitable site for the surface display of heterologous peptides on infectious MVM and structurally related parvoviruses.

VEbp may impair MVM nuclear capsid assembly. The infectivity of MVM-A7R, genome packaging, and capsid yield were severely hampered compared to wt MVM and MVM-P6L (Fig. 2). Genetic and biochemical analyses have shown that MVM assembly depends on translocation of trimeric intermediates across the nuclear envelope, driven by a structured nuclear localization motif (NLM) (28, 65-68). It was proposed that structured transport motifs may provide quality control for the capsid assembly pathway (67), which was also suggested for other parvoviruses (69, 70). The VP-A7R chimeric subunits accumulated in the nuclei of transfected cells (Fig. 3A), proving that the A7R peptide does not perturb NLM configuration and solvent exposure of the trimers. However, the VP-A7R subunits accumulated in the nucleus showed a patent assembly defect, composed of heterogeneous supraviral assemblies and/or aggregates with some viral particles embedded (Fig. 4). This pattern suggests that peptide A7R blocks the MVM assembly pathway at a structural switch that subunits must undergo to configure the 3-fold B7Mab binding epitope on the capsid surface (58), as this epitope is not formed by expressed (66) or isolated (28) trimers. Having two prolines in a row may impose high rigidity on peptide A7R, restricting the conformational flexibility required for subunits intertwining at the 3-fold axis (55, 56) to close the capsid shell. Aberrant contacts between the side chains of neighboring A7R residues on the 3-fold axis may lead to the misassembly and aggregation of subunits found in sedimentation analyses (Fig. 4 and 7). Previous evidence of peptide A7R structural rigidity was obtained when studying the VP2 and VP1 N termini running through the capsid channel that is required for MVM to initiate infection (52).

Immune interaction of MVM chimeras with the VEGF system. In our analysis of the constructed chimeras, VEbp-specific antibodies were used to demonstrate their exposure on the capsid and possible configuration restraints imposed by the folding and rearrangement of protein subunits accompanying capsid assembly. Peptide P6L was specifically recognized by the polyclonal anti-P6L antibody in chimeric VPs and purified viruses (Fig. 3 and 5A). P6L was selected as a VEGF mimic peptide binding neuropilin-1 and VEGF-R1 (15), but it has multiple interactive conformations and overlapping binding motifs (71). The recognition and partial neutralization of MVM-P6L by the polyclonal anti-P6L antibody indicates that capsid assembly does not mask all the P6L epitopes, although the precise configuration and immunogenicity of the remaining epitopes would require high-resolution structural analysis of the chimeric capsid.

The structure of peptide A7R in solution showed a significant secondary structure of the backbone that mimics the C-terminal domain of VEGF (72), and its native configuration could be traced with the -A7R MAb (13) used in this study. A7R could be recognized weakly but specifically by this antibody in cells expressing chimeric VPs and filter-bound viral particles (Fig. 3A and B), but not in MVM-A7R virions bound to EM

grids (Fig. 3C). Furthermore, the -A7R antibody failed to neutralize MVM-A7R grown in culture (Fig. 5A), as culturing resulted in a P6Q shift in the A7R sequence (Fig. 6) (see below). These data indicate that the native configuration of peptide A7R is severely constrained by a structural distortion imposed by MVM capsid at the 3-fold axis. However, MVM-A7R empty capsids induced anti-VEGF antibodies in mice (Fig. 5D), indicating that the inserted peptide A7R retains some native immunogenic epitopes. As the -A7R MAb neutralized VEGF and showed anti-vascularization and tumor-inhibitory properties (14), it is expected that the anti-VEGF polyclonal antibodies induced in mice by the MVM-A7R chimeric capsid would harbor potent VEGF neutralization and tumor-inhibitory capacities, as well. The anticancer capacity of MVM-A7R-based vaccines, therefore, deserves further research.

A crucial issue for the therapeutic application of parvoviruses is preexisting immunity (73). Since the parvovirus capsid is highly immunogenic, neutralizing antibodies are prevalent in human and animal populations following natural exposures. For example, humoral immune response against MVM in tumor-bearing mice was shown to prevent viral transcription (74), and prospective patients seeking to enroll in gene therapy trials with AAV vectors must have low neutralizing anti-AAV antibody titers (e.g., ClinicalTrials.gov registration no. NCT01620801). Importantly, the prominent 3-fold axis of symmetry forms the major immunogenic domain of the antigenically better-studied parvoviral capsids (75-80), and thus, 3-fold chimeras should presumably harbor enhanced immune evasion capacity. Accordingly, in our study, the MVM-P6L and MVM-A7R chimeras were fully resistant to the B7-MAb that efficiently neutralized the wt (Fig. 5), and MVM-PL6 further partly evaded a powerful polyclonal neutralizing anti-MVM capsid antibody (Fig. 5C). Replacing the epitopes of neutralizing antibodies with heterologous peptides may delineate a fundamental approach toward the development of therapeutic parvoviruses with privileged immune evasion properties.

Parvovirus evolution can modify heterologous peptides. The genetic stability of chimeric capsids has received little attention during the extensive manipulation of parvovirus genomes and vectoring technology. We addressed the impact of evolution on the genetic stability of the MVM-VEbp chimeras, given the rapid MVM evolutionary response to other biological pressures exerted on the capsid, such as antibody neutralization (59, 81) and adaptive virulence (61, 62, 82). Replacement of wt residues within loop 4 by peptide A7R did not result in selection of compensatory mutations in the other loops forming the spike, which may reflect their lack of contact with the engineered region (Fig. 6B). However, extensive passaging of MVM-A7R in culture did select for the P6Q single-amino-acid change within the engineered peptide, which restored capsid assembly efficiency (Fig. 7) and plaque-forming capacity (Fig. 6). This evolutionary change explains the slow progression of MVM-A7R in culture compared to the wt and MVM-P6L (Fig. 2A), as it needs to undergo the P6Q selection process, and also may explain the poor recognition (Fig. 3C) and neutralization (Fig. 5A) by the anti-A7R antibody. The P6Q change was consistently found in two independent cultures of MVM-A7R, suggesting that it is a highly preferred structural solution to overcome its assembly defect. An MVM-A7R-P6Q capsid structure resolved at high resolution may explain how contacts driven by the disposition of the glutamine side chain stabilize the VP subunit interactions at the 3-fold axis of the chimeric spike. Further, the assembly-escape P6Q mutant may inspire minimal genetic interventions to successfully overcome structural restrictions imposed by manipulations of the 3-fold axis. These observations also raise biosafety concerns for the large-scale therapeutic delivery of infectious parvovirus chimeras and replicative vectors.

Concluding remarks. This study shows that replacement of wt short amino acid sequences by heterologous peptides, and not merely insertions, is an optimal strategy to engineer the capsid of parvoviruses. The approach was illustrated in the engineering of oncolytic MVM with antiangiogenic VEbp, which endowed infectious chimeric viruses with the capacity to induce -VEGF antibodies and to evade neutralization by -MVM antibodies. Current efforts are focused on testing MVM-VEbp antineovascular-

ization and antitumor properties. These chimeric oncolytic viruses may bring important therapeutic benefits over passive -VEGF antibody regimes for immunocompetent cancer patients. We also demonstrated that the flexibility of introduced peptide sequences may impose severe structural restrictions on capsid assembly, which may lead to spontaneous selection of variants with enhanced viability. Conversely, subunit contact and intertwining at the 3-fold axis of the capsid may alter peptide configurations, partly disabling their immunogenic functions. These findings may be of paramount relevance to ongoing development of parvoviral cancer and gene therapy applications. We speculate that peptides with fewer structural requirements, or insertions in other capsid domains with different surface topologies, might overcome these restrictions. However, on the basis of this study and the dynamic evolution of these ssDNA viruses, we anticipate that isolation of genetically stable replicative parvoviruses exposing heterologous peptides in immunodominant capsid domains will remain a challenging task.

MATERIALS AND METHODS

Cells and viruses. The NB324K simian virus 40 (SV40)-transformed human newborn kidney cell line (83) was maintained in Dulbecco's modified Eagle medium (DMEM) supplemented with 5% fetal calf serum (Gibco BRL). For routine transfections 3×10^6 cells were electroporated with 10 μ g of plasmid following a previously described method (84), but the growth of chimeric viruses usually required transfection at a large scale (52).

The prototype (p) strain of the *Protoparvovirus* MVM (19, 24) was used in this study. Viral stocks of MVMp and chimeric viruses were harvested 48 hpt and purified from cellular pellets by sucrose cushions and cesium chloride equilibrium centrifugation, as previously described (50, 52, 85). Viral particles in fractions corresponding to the density of DNA-filled virus were pooled, dialyzed against phosphate-buffered saline (PBS), and kept at 70°C in aliquots. The MVM-A7R chimeric DNA-filled virus preparations were concentrated by centrifugation at 4°C in Amicon Ultra-15 filters (Millipore) as recommended by the manufacturer. The titers of infectious viruses were determined by a standard PFU assay (50) or by determining the number of VP-expressing cells (units of immunofluorescence; UIF) by inoculating NB324K cell monolayers grown on coverslips with duplicate serial dilutions, as previously described (52, 84). The amounts of structural proteins in purified virus preparations (Fig. 3B) were determined by SDS-PAGE using bovine serum albumin (BSA) as a standard (52). The limiting amounts of MVM-A7R virions were determined by hemagglutination to mouse erythrocytes (86) using the homologous empty capsid as a reference. Virus genome replication was monitored by Southern blotting using 1% agarose gels loaded with low-molecular-weight DNA (84) obtained from electroporated NB324K cells. Samples were alkali blotted to filters and hybridized with an MVM full-length probe labeled by random priming using a DIG High Prime DNA-labeling and detection starter kit II (Roche Applied Science) according to the manufacturer's protocol.

Construction of MVM-VEbp chimeras. Spike virus chimeras were constructed by mutagenesis. The MVM-P6L chimera has the P434-N439 VP2 residues deleted and replaced by the peptide P6L residues PQRPL (nucleotides 4093 to 4111 were replaced by 5'-CAGCCACGCCCACTG-3'). The MVM-A7R chimera has the VP2 residues N433 to N439 deleted and replaced by the peptide A7R residues ATWLPPR (nucleotides 4090 to 4111, 5'-AACCCATTGGGACTAAAAAT-3', were substituted by directed mutagenesis for 5'-GCCACGTGGCTGCCCGGAGG-3'). The DNA template used in all the mutants was the pSVtk-VPs (87), which expresses the VP1 and VP2 proteins of MVMp under the control of the SV40-thymidine kinase enhancer-promoter. Flanking oligonucleotides used at the 5' and 3' extremes were S1 (5'-GGGGAATT CGCTCAAGGGAGCAGACATGG-3') and S2 (5'-GTAACAATTCTAGAAAGTGTGGCTCCG-3'), corresponding to nucleotides 3721 to 3740 with an EcoRI site inserted upstream of nucleotide 3721, in the S1 primer, and nucleotides 4329 to 4355 of the MVM genome sequence in the S2 primer. To insert the different peptides, we used V3A (5'-CAGTGGCGTGGCTGAGGGTTTGCATTTGTAAGAATG-3') and V4A (5'-CCTCAG CCACGCCCACTGGACATTTTCAAATG-3') for peptide P6L and V3C (5'-CCTCGGCGGCAGCCACGTGG CTGCAATTTGTAAGAATG-3') and V4C (5'-GCCACGTGGCTGCCCGGAGGACATTTTCAAATG-3') to insert peptide A7R. High-fidelity Platinum *Pfx* (Invitrogen) and *Pwo* (Roche) polymerases were used with the PCR programs of the manufacturer. The amplified fragments were cloned into pUC19 by digestion with the EcoRI and XbaI restriction enzymes and then cloned into the pMM984 infectious plasmid (63) between the HpaI and XbaI restriction sites (nucleotides 3759 to 4342). Genomic plasmids were always grown from a single transformed colony of *Escherichia coli* JC8111, a bacterial strain that permits deletion-resistant propagation of MVM plasmid clones bearing terminal palindromes (88), and sequenced to verify the absence of additional mutations. Plasmids were purified on a large scale with Plasmid Maxi kits (Qiagen) using the manufacturer's protocol.

The pSV-VP-P6L, pSV-VP-A7R, and pSV-VP-A7R-P6Q plasmid clones were constructed by replacing the respective amplified EcoRI-XbaI fragments mentioned above with the HpaI-XbaI fragment (nucleotides 3759 to 4342) of the pSVtk-VPs plasmid (87). These plasmids were transformed into and purified from the *E. coli* DH5 bacteria.

Antibodies. The MVM antibodies used in this work have been previously described: the -VP rabbit polyclonal antiserum was raised in rabbit against denatured VP2 and used for the general localization of

the VP1 and VP2 proteins independently of the configuration (65); the B7 mouse monoclonal antibody (B7-MAb), which recognizes an epitope configured by an intact empty capsid and DNA-filled virus localized at the 3-fold axes (58, 59) but fails to react with isolated VP subunits or trimers (28, 66); and the -MVM antibody raised in rabbit against the native capsid and used to recognize mainly conformational epitopes (67, 89).

Specific antibodies of the VEGF system were as follows: the -P6L rabbit polyclonal antibody was raised against the 12-mer PQPRPLPQPRPL peptide sequence (a dimer of the P6L peptide) coupled to keyhole limpet hemocyanin (KLH) and administered by injection (100 μ g per dose) in a first dose emulsified in Freund's complete adjuvant followed by two boost injections in incomplete adjuvant. Bleeding was done 10 days after the last injection, and the serum was affinity purified (NAb protein G; Thermo); the -A7R antibody corresponds to a commercial -VEGF mouse monoclonal antibody (Sigma; V4758) that binds human native VEGF and neutralizes its biological activity. This antibody was used to identify by phage display the 7-mer ATWLPPR anti-angiogenic A7R peptide binding neuropilin-1 (13). Recombinant biologically active human VEGF-A (Peprtech 100-20) was used to control the -A7R antibody activity.

Immunological methods. Double-label indirect IF was performed with cells seeded onto glass coverslips following previously described protocols (65). Secondary antibodies (Jackson Immuno-research; used at 1/1,000 dilution) were an -rabbit IgG conjugated to Texas Red (TXRD) and an -mouse IgG conjugated to fluorescein isothiocyanate (FITC). Slot-dot analysis under vacuum was performed as recommended by the manufacturer (Hoeffer) with nitrocellulose membranes (Scheider and Schull) and applying samples under native conditions diluted in PBS (Fig. 3B and 5D) or in denatured configuration diluted in PBS with 0.1% SDS for best VP quantitation (Fig. 4A and 7). Filters were developed as described above with the primary antibodies indicated in the figures and secondary anti-rabbit or anti-mouse antibodies, IgGs conjugated with peroxidase.

For mouse immunization, 8-week-old BALB/c mice were injected in the tail vein with wt MVMp and chimeric (MVM-P6L or MVM-A7R) purified capsids and DNA-filled virions. A single injection of 1 μ g of viral particles in 100 μ l of PBS without adjuvant was administered per mouse, and whole blood was collected 1 month postinjection. The blood was coagulated at 37°C for 20 min and centrifuged at 2,000 \times g for 10 min at 4°C, and the serum was heat inactivated at 55°C for 15 min and stored in aliquots at -70°C.

Electron microscopy. Virus particles were adsorbed for 15 min to glow-discharged collodion/carbon-coated copper grids, washed with water, and negatively stained for 50 s with 2% uranyl acetate before visualization. For immunogold labeling, the grid-adsorbed particles were incubated for 30 min with the primary antibodies at dilutions indicated in the figure legends. Bound antibodies were labeled for 30 min with protein A conjugated to 5-nm gold particles (EM Laboratory, Utrecht University, Utrecht, The Netherlands) or a goat anti-mouse IgG conjugated to 5-nm gold particles (British Biocell International). Finally, specimens were negatively stained with 2% uranyl acetate and visualized under a JEOL (Tokyo, Japan) JEM-1010 electron microscope equipped with a TVIPS F416 camera (Gauting, Germany).

Genetic analyses. To study chimeric-virus evolution, low-molecular-weight DNA was prepared as described previously (87) from MVM-A7R stocks and infected cell cultures and used as a template to obtain molecular clones by PCR amplification with the primers vVP-3 (5'-CGCACTAGACCACCTGC-3') and VPSeq-1 (5'-GTTTCCAGTAGCAGTTGG-3'). The product was digested with NspI restriction enzyme, the VP2 fragment encompassing the four loops of the spike was cloned into pUC19 at the SphI site and transformed into the DH5 strain of *E. coli*, and plasmids were purified from the bacterial clones (Wizard Plus SV minipreps; Promega). Infectious MVM, MVM-P6L, and MVM-A7R clones were isolated from plaques (PFU) formed in NB324K cell monolayers stained with phenyl red in low gelling point (LM-GCT) agarose. Each viral clone was incubated in 100 μ l of Tris (50 mM, pH 7.5) at 4°C overnight, clarified by centrifugation, and stored at 20°C. Samples were amplified using GoTaq Green Master Mix (Promega) and the vVP4 (2945 to 2961; 5'-CGCATTATAGATTCTTG-3'), vVP-3 (2704 to 2720; 5'-CGCACTAGACCACC TGC-3'), and VPSeq-2 (5'-CCATTTAGTGGTGGTGG-3') primers to amplify the regions containing loops 1, 2, and 3 and the WP-8 (5'-GCCAATGGCAGTGTAG-3') and VPSeq-1 (4489 to 4506; 5'-GTTTCCAGTAGC AGTTGG-3') primers for the region of loop 4. The amplified DNA fragments were cut off and purified (Wizard SV Gel and PCR Clean-Up System; Promega) from the agarose gels and sequenced by automated sequencing. Mutations were confirmed by two rounds of sequence analysis with DNASTar Lasergene v7.1.0 and BioEdit sequence alignment editor v7.0.9.0 software.

Capsid assembly. To characterize capsid assembly patterns, genomic (wt or chimeric) plasmids, as well as plasmids expressing VPs only (pSVtk-VP derivatives), were transfected into NB324K cells, and protein extracts were subjected to sedimentation analysis performed as described previously (66). In brief, transfected cells washed with PBS were scraped in 50 mM HEPES, pH 8.0, 150 mM NaCl, 2 mM MgCl₂, 1 mM EDTA (HNEM buffer) supplemented with protease (0.1 mM phenylmethylsulfonyl fluoride [PMSF], 10 μ g/ml leupeptin, 10 μ g/ml pepstatin, 10 μ g/ml aprotinin, 100 μ g/ml TPCK [tosylsulfonyl phenylalanyl chloromethyl ketone]) and phosphatase (20 mM glycerol phosphate, 5 mM NaF) inhibitors and disrupted in a cooled water bath sonicator. The cellular lysates were clarified by centrifugation at 15,000 \times g and 4°C for 30 min in a benchtop centrifuge, layered onto 14 ml of 5% to 30% sucrose gradients prepared in HNEM, and ultracentrifuged at 160,000 \times g in a SW40 rotor (Beckman) at 5°C for 6 h for the analysis of capsid formation or 1 h for supraviral assemblies and aggregates. The molecular size markers were thyroglobulin (669 kDa; 19S; Sigma) and the following gradient-purified viral particles: MVMp empty capsid (70S), MVMp DNA-filled virion (110S), and 29 (254S) and 29 (390S) bacteriophages. Fractions were tested for infectivity (UIF), and VP amounts by slot-blotting (Hoefer) applying the samples under vacuum onto nitrocellulose membranes and developed with the -VP polyclonal antibody. For quantitation of VP signals, films were scanned with a densitometer (Bio-Rad GS-900), and the relative

band intensities were determined with Image Lab v.5.2 (Bio-Rad). For EM inspection, fractions were dialyzed against PBS and concentrated by centrifugation in Centricon Ultracel YM-30 filters (Millipore) at 4°C, as recommended by the manufacturer, prior to immunogold labeling.

SUPPLEMENTAL MATERIAL

Supplemental material for this article may be found at <https://doi.org/10.1128/JVI.00798-19>.

SUPPLEMENTAL FILE 1, MOV file, 12 MB.

SUPPLEMENTAL FILE 2, PDF file, 0.04 MB.

ACKNOWLEDGMENTS

E.G., C.S.-M., and T.C.-L. contributed equally to this work.

We are indebted to P. Tattersall (Yale University, New Haven, CT) for generously providing the original pMM984 molecular clone of MVMp. Technical support by J. González-Nicolás is also acknowledged.

T.C.-L. is the recipient of a contract from Comunidad de Madrid (PEJ16/MED/AI-0818), and G.A. is supported by the Amarouto Program (Comunidad de Madrid). This work was supported by the following grants: contract QLK3-CT-2001-01010 (European Commission), SAF2011-29403 (Spanish Ministerio de Ciencia e Innovación), SAF2015-68522-P-MINECO/FEDER, UE (Spanish Ministerio de Economía y Competitividad and Ministerio de Ciencia, Investigación y Universidades), and S2013/ABI-2906-FEDER (Comunidad de Madrid) to J.M.A. and institutional grants from the Fundación Ramón Areces and Banco Santander to the Centro de Biología Molecular Severo Ochoa (CSIC-UAM).

REFERENCES

- Plate KH, Breier G, Weich HA, Risau W. 1992. Vascular endothelial growth factor is a potential tumour angiogenesis factor in human gliomas *in vivo*. *Nature* 359:845-848. <https://doi.org/10.1038/359845a0>.
- Carmeliet P, Jain RK. 2011. Molecular mechanisms and clinical applications of angiogenesis. *Nature* 473:298-307. <https://doi.org/10.1038/nature10144>.
- Robinson CJ, Stringer SE. 2001. The splice variants of vascular endothelial growth factor (VEGF) and their receptors. *J Cell Sci* 114:853-865.
- Dings RP, Vang KB, Castemans K, Popescu F, Zhang Y, Oude Egbrink MG, Mescher MF, Farrar MA, Griffioen AW, Mayo KH. 2011. Enhancement of T-cell mediated antitumor response: angiostatic adjuvant to immunotherapy against cancer. *Clin Cancer Res* 17:3134-3145. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-10-2443>.
- Schoenfeld JD, Dranoff G. 2011. Anti-angiogenesis immunotherapy. *Hum Vaccin* 7:976-981. <https://doi.org/10.4161/hv.7.9.16407>.
- Shih T, Lindley C. 2006. Bevacizumab: an angiogenesis inhibitor for the treatment of solid malignancies. *Clin Ther* 28:1779-1802. <https://doi.org/10.1016/j.clinthera.2006.11.015>.
- Sandler A, Gray R, Perry MC, Brahmer J, Schiller JH, Dowlati A, Lilenbaum R, Johnson DH. 2006. Paclitaxel-carboplatin alone or with bevacizumab for non-small-cell lung cancer. *N Engl J Med* 355:2542-2550. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa061884>.
- Ferrara N, Adamis AP. 2016. Ten years of anti-vascular endothelial growth factor therapy. *Nat Rev Drug Discov* 15:385-403. <https://doi.org/10.1038/nrd.2015.17>.
- Wentink MQ, Hackeng TM, Tabruyn SP, Puijk WC, Schwamborn K, Altschuh D, Melen RH, Schuurman T, Griffioen AW, Timmerman P. 2016. Targeted vaccination against the bevacizumab binding site on VEGF using 3D-structured peptides elicits efficient antitumor activity. *Proc Natl Acad Sci U S A* 113:12532-12537. <https://doi.org/10.1073/pnas.1610258113>.
- Yang Y, Zhang Y, Cao Z, Ji H, Yang X, Iwamoto H, Wahlberg E, Länne T, Sun B, Cao Y. 2013. Anti-VEGF- and anti-VEGF receptor-induced vascular alteration in mouse healthy tissues. *Proc Natl Acad Sci U S A* 110:12018-12023. <https://doi.org/10.1073/pnas.1301331110>.
- Gavilondo JV, Hernández-Bernal F, Ayala-Ávila M, de la Torre AV, de la Torre J, Morera-Díaz Y, Bequet-Romero M, Sánchez J, Valenzuela CM, Martín Y, Selmán-Housein KH, Garabito A, Lazo OC, CENTAURO Group of Investigators. 2014. Specific active immunotherapy with a VEGF vaccine in patients with advanced solid tumors. Results of the CENTAURO antigen dose escalation phase I clinical trial. *Vaccine* 32:2241-2250. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2013.11.102>.
- Vicari D, Foy KC, Liotta EM, Kaumaya PT. 2011. Engineered conformation-dependent VEGF peptide mimics are effective in inhibiting VEGF signaling pathways. *J Biol Chem* 286:13612-13625. <https://doi.org/10.1074/jbc.M110.216812>.
- Binétruy-Tournaire R, Demangel C, Malavaud B, Vassy R, Rouyre S, Kraemer M, Plouët J, Derbin C, Perret G, Mazié JC. 2000. Identification of a peptide blocking vascular endothelial growth factor (VEGF)-mediated angiogenesis. *EMBO J* 19:1525-1533. <https://doi.org/10.1093/emboj/19.7.1525>.
- Starzec A, Vassy R, Martin A, Lecouvey M, Di Benedetto M, Crépin M, Perret GY. 2006. Antiangiogenic and antitumor activities of peptide inhibiting the vascular endothelial growth factor binding to neuropilin-1. *Life Sci* 79:2370-2381. <https://doi.org/10.1016/j.lfs.2006.08.005>.
- Giordano RJ, Cardó-Vila M, Lahdenranta J, Pasqualini R, Arap W. 2001. Biopanning and rapid analysis of selective interactive ligands. *Nat Med* 7:1249-1253. <https://doi.org/10.1038/nm1101-1249>.
- Pan Q, Chanthery Y, Liang WC, Stawicki S, Mak J, Rathore N, Tong RK, Kowalski J, Yee SF, Pacheco G, Ross S, Cheng Z, Le Couter J, Plowman G, Peale F, Koch AW, Wu Y, Bagri A, Tessier-Lavigne M, Watts RJ. 2007. Blocking neuropilin-1 function has an additive effect with anti-VEGF to inhibit tumor growth. *Cancer Cell* 11:53-67. <https://doi.org/10.1016/j.ccr.2006.10.018>.
- Miest TS, Cattaneo R. 2014. New viruses for cancer therapy: meeting clinical needs. *Nat Rev Microbiol* 12:23-34. <https://doi.org/10.1038/nmicro3140>.
- Bell J, McFadden G. 2014. Viruses for tumor therapy. *Cell Host Microbe* 15:260-265. <https://doi.org/10.1016/j.chom.2014.01.002>.
- Cotmore SF, Agbandje-McKenna M, Chiorini JA, Mukha DV, Pintel DJ, Qiu J, Soderlund-Venermo M, Tattersall P, Tijssen P, Gatherer D, Davison AJ. 2014. The family *Parvoviridae*. *Arch Virol* 159:1239-1247. <https://doi.org/10.1007/s00705-013-1914-1>.
- Toolan HW, Rhode SL, III, Gierthy JF. 1982. Inhibition of 7, 12-dimethylbenz(a)anthracene-induced tumors in Syrian hamster by prior infection with H-1 parvovirus. *Cancer Res* 42:2552-2555.
- Rommelaere J, Geletneky K, Angelova AL, Daeffler L, Dinsart C, Kiprianova I, Schlehofer JR, Raykov Z. 2010. Oncolytic parvoviruses as cancer

- therapeutics. *Cytokine Growth Factor Rev* 21:185-195. <https://doi.org/10.1016/j.cytogfr.2010.02.011>.
22. Santiago-Ortiz JL, Schaffer DV. 2016. Adeno-associated virus (AAV) vectors in cancer gene therapy. *J Control Release* 240:287-301. <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2016.01.001>.
 23. Geletneky K, Hajda J, Angelova AL, Leuchs B, Capper D, Bartsch AJ, Neumann JO, Schöning T, Hüsing J, Beelte B, Kiprianova I, Roscher M, Bhat R, von Deimling A, Brück W, Just A, Frehtman V, Löbhard S, Terletskaja-Ladwig E, Fry J, Jochims K, Daniel V, Krebs O, Dahm M, Huber B, Unterberg A, Rommelaere J. 2017. Oncolytic H-1 parvovirus shows safety and signs of immunogenic activity in a first phase I/IIa glioblastoma trial. *Mol Ther* 25:2620-2634. <https://doi.org/10.1016/j.ymthe.2017.08.016>.
 24. Crawford LV. 1966. A minute virus of mice. *Virology* 29:605-612. [https://doi.org/10.1016/0042-6822\(66\)90284-4](https://doi.org/10.1016/0042-6822(66)90284-4).
 25. Segovia JC, Real A, Bueren J, Almendral JM. 1991. *In vitro* myelosuppressive effects of the parvovirus minute virus of mice (MVMi) on hematopoietic stem and committed progenitor cells. *Blood* 77:980-988.
 26. Mousset S, Rommelaere J. 1982. Minute virus of mice inhibits cell transformation by simian virus 40. *Nature* 300:537-539. <https://doi.org/10.1038/300537a0>.
 27. Rubio MP, Guerra S, Almendral JM. 2001. Genome replication and post-encapsidation functions mapping to the non-structural gene restrict the host range of a murine parvovirus in human cells. *J Virol* 75:11573-11582. <https://doi.org/10.1128/JVI.75.23.11573-11582.2001>.
 28. Riobos L, Valle N, Hernando E, Maroto B, Kann M, Almendral JM. 2010. Viral oncolysis that targets Raf-1 signaling control of nuclear transport. *J Virol* 84:2090-2099. <https://doi.org/10.1128/JVI.01550-09>.
 29. Ventoso I, Berlanga JJ, Almendral JM. 2010. Translation control by protein kinase R restricts minute virus of mice infection: role in parvovirus oncolysis. *J Virol* 84:5043-5051. <https://doi.org/10.1128/JVI.02188-09>.
 30. Paglino JC, Ozduman K, van den Pol AN. 2012. Lull1 parvovirus selectively and efficiently targets replicates in, and kills human glioma cells. *J Virol* 86:7280-7291. <https://doi.org/10.1128/JVI.00227-12>.
 31. Guetta E, Graziani Y, Tal J. 1986. Suppression of Ehrlich ascites tumors in mice by minute virus of mice. *J Natl Cancer Inst* 76:1177-1180.
 32. Arulanandam R, Batenchuk C, Angarita FA, Ottolino-Perry K, Cousineau S, Mottashed A, Burgess E, Falls TJ, De Silva N, Tsang J, Howe GA, Bourgeois-Daigneault M-C, Conrad DP, Daneshmand M, Breibach CJ, Kim DH, Raptis L, Sad S, Atkins H, Huh MS, Diallo J-S, Lichty BD, Ilkow CS, Le Boeuf F, Addison CL, McCart JA, Bell JC. 2015. VEGF-mediated induction of PRD1-BF1/Blimp1 expression sensitizes tumor vasculature to oncolytic virus infection. *Cancer Cell* 28:210-224. <https://doi.org/10.1016/j.ccell.2015.06.009>.
 33. Thorne SH, Tam BYY, Kim DH, Contag CH, Kuo CJ. 2006. Selective intratumoral amplification of an antiangiogenic vector by an oncolytic virus produces enhanced antivascular and anti-tumor efficacy. *Mol Ther* 13:938-946. <https://doi.org/10.1016/j.ymthe.2005.12.010>.
 34. Yu DC, Lee JS, Yoo JY, Shin H, Deng H, Wei Y, Yun CO. 2012. Soluble vascular endothelial growth factor decoy receptor FP3 exerts potent antiangiogenic effects. *Mol Ther* 20:938-947. <https://doi.org/10.1038/mt.2011.285>.
 35. Watanabe M, Boyer JL, Crystal RG. 2010. AAVrh.10-mediated genetic delivery of bevacizumab to the pleura to provide local anti-VEGF to suppress growth of metastatic lung tumors. *Gene Ther* 17:1042-1051. <https://doi.org/10.1038/gt.2010.87>.
 36. Xie Y, Hicks MJ, Kaminsky SM, Moore MA, Crystal RG, Raffi A. 2014. AAV-mediated persistent bevacizumab therapy suppresses tumor growth of ovarian cancer. *Gynecol Oncol* 135:325-332. <https://doi.org/10.1016/j.ygyno.2014.07.105>.
 37. Sedlik C, Saron M, Sarraseca J, Casal I, Leclerc C. 1997. Recombinant parvovirus-like particles as an antigen carrier: a novel nonreplicative exogenous antigen to elicit protective antiviral cytotoxic T cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94:7503-7508. <https://doi.org/10.1073/pnas.94.14.7503>.
 38. Rueda P, Hurtado A, del Barrio M, Martínez-Torrecuadrada JL, Kamstrup S, Leclerc C, Casal JI. 1999. Minor displacements in the insertion site provoke major differences in the induction of antibody responses by chimeric parvovirus-like particles. *Virology* 263:89-99. <https://doi.org/10.1006/viro.1999.9911>.
 39. Rodríguez D, González-Asequinolaza G, Rodríguez JR, Vijayan A, Gherardi M, Rueda P, Casal JI, Esteban M. 2012. Vaccine efficacy against malaria by the combination of porcine parvovirus-like particles and vaccinia virus vectors expressing CS of Plasmodium. *PLoS One* 7:e34445. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0034445>.
 40. Rybniker J, Nowag A, Janicki H, Demant K, Hartmann P, Büning H. 2012. Incorporation of antigens into viral capsids augments immunogenicity of adeno-associated virus vector-based vaccines. *J Virol* 86:13800-13804. <https://doi.org/10.1128/JVI.01708-12>.
 41. Girod A, Ried M, Wobus C, Lahm H, Leike K, Kleinschmidt J, Deleage G, Hallek M. 1999. Genetic capsid modifications allow efficient re-targeting of adeno-associated virus type 2. *Nat Med* 5:1438. <https://doi.org/10.1038/71021>.
 42. Shi W, Arnold GS, Bartlett JS. 2001. Insertional mutagenesis of the adeno-associated virus type 2 (AAV2) capsid gene and generation of AAV2 vectors targeted to alternative cell-surface receptors. *Hum Gene Ther* 12:1697-1711. <https://doi.org/10.1089/104303401750476212>.
 43. Muller OJ, Kaul F, Weitzman MD, Pasqualini R, Arap W, Kleinschmidt JA, Trepel M. 2003. Random peptide libraries displayed on adeno-associated virus to select for targeted gene therapy vectors. *Nat Biotechnol* 21:1040-1046. <https://doi.org/10.1038/nbt856>.
 44. Warrington KH, Jr, Gorbatyuk OS, Harrison JK, Opie SR, Zolotukhin S, Muzyczka N. 2004. Adeno-associated virus type 2 VP2 capsid protein is nonessential and can tolerate large peptide insertions at its N terminus. *J Virol* 78:6595-6609. <https://doi.org/10.1128/JVI.78.12.6595-6609.2004>.
 45. Asokan A, Conway JC, Phillips JL, Li C, Hegge J, Sinnott R, Yadav S, DiPrimio N, Nam HJ, Agbandje-McKenna M, McPhee S, Wolff J, Samulski RJ. 2010. Reengineering a receptor footprint of adeno-associated virus enables selective and systemic gene transfer to muscle. *Nat Biotechnol* 28:79-82. <https://doi.org/10.1038/nbt.1599>.
 46. Lisowski L, Dane AP, Chu K, Zhang Y, Cunningham SC, Wilson EM, Nygaard S, Grompe M, Alexander IE, Kay MA. 2014. Selection and evaluation of clinically relevant AAV variants in a xenograft liver model. *Nature* 506:382-386. <https://doi.org/10.1038/nature12875>.
 47. Paulk NK, Pekrun K, Zhu E, Nygaard S, Li B, Xu J, Chu K, Leborgne C, Dane AP, Haft A, Zhang Y, Zhang F, Morton C, Valentine MB, Davidoff AM, Nathwani AC, Mingozzi F, Grompe M, Alexander IE, Lisowski L, Kay MA. 2018. Bioengineered AAV capsids with combined high human liver transduction *in vivo* and unique humoral seroreactivity. *Mol Ther* 26:289-303. <https://doi.org/10.1016/j.ymthe.2017.09.021>.
 48. Carreira A, Menendez M, Reguera J, Almendral JM, Mateu MG. 2004. *In vitro* disassembly of a parvovirus capsid and effect on capsid stability of heterologous peptide insertions in surface loops. *J Biol Chem* 279:6517-6525. <https://doi.org/10.1074/jbc.M307662200>.
 49. Hurtado A, Rueda P, Nowicky J, Sarraseca J, Casal JI. 1996. Identification of domains in canine parvovirus VP2 essential for the assembly of virus-like particles. *J Virol* 70:5422-5429.
 50. Gil-Ranedo J, Hernando E, Valle N, Riobos L, Maroto B, Almendral JM. 2018. Differential phosphorylation and N-terminal configuration of capsid subunits in parvovirus assembly and viral trafficking. *Virology* 518:184-194. <https://doi.org/10.1016/j.virol.2018.02.018>.
 51. Ros C, Bayat N, Wolfisberg R, Almendral JM. 2017. Protovirus cell entry. *Viruses* 9:313. <https://doi.org/10.3390/v9110313>.
 52. Sánchez-Martínez C, Grueso E, Carroll M, Rommelaere J, Almendral JM. 2012. Essential role of the unordered VP2 N-terminal domain of the parvovirus MVM capsid in nuclear assembly and endosomal enlargement of the virion fivefold channel for cell entry. *Virology* 432:45-56. <https://doi.org/10.1016/j.virol.2012.05.025>.
 53. Agbandje-McKenna M, Llamas-Saiz AL, Wang F, Tattersall P, Rossmann MG. 1998. Functional implications of the structure of the murine parvovirus, minute virus of mice. *Structure* 6:1369-1381. [https://doi.org/10.1016/S0969-2126\(98\)00137-3](https://doi.org/10.1016/S0969-2126(98)00137-3).
 54. Kontou M, Govindasamy L, Nam HJ, Bryant N, Llamas-Saiz AL, Foces-Foces C, Hernando E, Rubio MP, McKenna R, Almendral JM, Agbandje-McKenna M. 2005. Structural determinants of tissue tropism and *in vivo* pathogenicity for the parvovirus minute virus of mice. *J Virol* 79:10931-10943. <https://doi.org/10.1128/JVI.79.17.10931-10943.2005>.
 55. Tsao J, Chapman MS, Agbandje M, Keller W, Smith K, Wu H, Luo M, Smith TJ, Rossmann MG, Compans RW, Parrish CR. 1991. The three-dimensional structure of canine parvovirus and its functional implications. *Science* 251:1456-1464. <https://doi.org/10.1126/science.2006420>.
 56. Xie Q, Bu W, Bhatia S, Hare J, Somasundaram T, Azzi A, Chapman MS. 2002. The atomic structure of adeno-associated virus (AAV-2), a vector for human gene therapy. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99:10405-10410. <https://doi.org/10.1073/pnas.162250899>.
 57. Gurda BL, Parent KN, Bladec H, Sinkovits RS, DiMattia MA, Rence C, Castro A, McKenna R, Olson N, Brown K, Baker TS, Agbandje-McKenna M.

2010. Human bocavirus capsid structure: insights into the structural repertoire of the parvoviridae. *J Virol* 84:5880-5889. <https://doi.org/10.1128/JVI.02719-09>.
58. Kaufmann B, Lopez-Bueno A, Mateu MG, Chipman PR, Nelson CD, Parrish CR, Almendral JM, Rossmann MG. 2007. Minute virus of mice, a parvovirus, in complex with the Fab fragment of a neutralizing monoclonal antibody. *J Virol* 81:9851-9858. <https://doi.org/10.1128/JVI.00775-07>.
 59. Lopez-Bueno A, Mateu MG, Almendral JM. 2003. High mutant frequency in populations of a DNA virus allows evasion from antibody therapy in an immunodeficient host. *J Virol* 77:2701-2708. <https://doi.org/10.1128/JVI.77.4.2701-2708.2003>.
 60. Gardiner EM, Tattersall P. 1988. Mapping of the fibrotropic and lymphotropic host range determinants of the parvovirus minute virus of mice. *J Virol* 62:2605-2613.
 61. Lopez-Bueno A, Rubio MP, Bryant N, McKenna R, Agbandje-McKenna M, Almendral JM. 2006. Host-selected amino acid changes at the sialic acid binding pocket of the parvovirus capsid modulate cell binding affinity and determine virulence. *J Virol* 80:1563-1573. <https://doi.org/10.1128/JVI.80.3.1563-1573.2006>.
 62. Lopez-Bueno A, Segovia JC, Bueren JA, O'Sullivan MG, Wang F, Tattersall P, Almendral JM. 2008. Evolution to pathogenicity of the parvovirus minute virus of mice in immunodeficient mice involves genetic heterogeneity at the capsid domain that determines tropism. *J Virol* 82:1195-1203. <https://doi.org/10.1128/JVI.01692-07>.
 63. Merchlinsky MJ, Tattersall PJ, Leary JJ, Cotmore SF, Gardiner EM, Ward DC. 1983. Construction of an infectious molecular clone of the autonomous parvovirus minute virus of mice. *J Virol* 47:227-232.
 64. Tullis GE, Burger LR, Pintel DJ. 1993. The minor capsid protein VP1 of the autonomous parvovirus minute virus of mice is dispensable for encapsidation of progeny single-stranded DNA but is required for infectivity. *J Virol* 67:131-141.
 65. Gil-Ranedo J, Hernando E, Riobos L, Domínguez C, Kann M, Almendral JM. 2015. The mammalian cell cycle regulates parvovirus nuclear capsid assembly. *PLoS Pathog* 11:e1004920. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1004920>.
 66. Riobos L, Reguera J, Mateu MG, Almendral JM. 2006. Nuclear transport of trimeric assembly intermediates exerts a morphogenetic control on the icosahedral parvovirus capsid. *J Mol Biol* 357:1026-1038. <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2006.01.019>.
 67. Lombardo E, Ramirez JC, Agbandje-McKenna M, Almendral JM. 2000. A beta-stranded motif drives capsid protein oligomers of the parvovirus minute virus of mice into the nucleus for viral assembly. *J Virol* 74:3804-3814. <https://doi.org/10.1128/JVI.74.8.3804-3814.2000>.
 68. Almendral JM. 2013. Assembly of simple icosahedral viruses. *Subcell Biochem* 68:307-328. https://doi.org/10.1007/978-94-007-6552-8_10.
 69. Pillet S, Annan Z, Fichelson S, Morinet F. 2003. Identification of a nonconventional motif necessary for the nuclear import of the human parvovirus B19 major capsid protein (VP2). *Virology* 306:25-32. [https://doi.org/10.1016/S0042-6822\(02\)00047-8](https://doi.org/10.1016/S0042-6822(02)00047-8).
 70. Boisvert M, Bouchard-Lévesque V, Fernandes S, Tijssen P. 2014. Classic nuclear localization signals and a novel nuclear localization motif are required for nuclear transport of porcine parvovirus capsid proteins. *J Virol* 88:11748-11759. <https://doi.org/10.1128/JVI.01717-14>.
 71. Giordano RJ, Anobom CD, Cardó-Vila M, Kalil J, Valente AP, Pasqualini R, Almeida FC, Arap W. 2005. Structural basis for the interaction of a vascular endothelial growth factor mimic peptide motif and its corresponding receptors. *Chem Biol* 12:1075-1083. <https://doi.org/10.1016/j.chembiol.2005.07.008>.
 72. Starzec A, Ladam P, Vassy R, Badache S, Bouchemal N, Navaza A, Du Penhoat CH, Perret GY. 2007. Structure-function analysis of the antiangiogenic ATWLPPR peptide inhibiting VEGF (165) binding to neuropilin-1 and molecular dynamics simulations of the ATWLPPR/neuropilin-1 complex. *Peptides* 28:2397-2402. <https://doi.org/10.1016/j.peptides.2007.09.013>.
 73. Louis Jeune V, Joergensen JA, Hajjar RJ, Weber T. 2013. Pre-existing anti-adenovirus antibodies as a challenge in AAV gene therapy. *Hum Gene Ther Methods* 24:59-67. <https://doi.org/10.1089/hgtb.2012.243>.
 74. Lang SI, Giese NA, Rommelaere J, Dinsart C, Cornelis JJ. 2006. Humoral immune responses against minute virus of mice vectors. *J Gene Med* 8:1141-1150. <https://doi.org/10.1002/jgm.940>.
 75. Langeveld JP, Casal JI, Vela C, Dalsgaard K, Smale SH, Puijk WC, Meloen RH. 1993. B-cell epitopes of canine parvovirus: distribution on the primary structure and exposure on the viral surface. *J Virol* 67:765-772.
 76. Bloom ME, Best SM, Hayes SF, Wells RD, Wolfinger JB, McKenna R, Agbandje-McKenna M. 2001. Identification of Aleutian mink disease parvovirus capsid sequences mediating antibody-dependent enhancement of infection, virus neutralization, and immune complex formation. *J Virol* 75:11116-11127. <https://doi.org/10.1128/JVI.75.22.11116-11127.2001>.
 77. Hafenstein S, Bowman VD, Sun T, Nelson CD, Palermo LM, Chipman PR, Battisti AJ, Parrish CR, Rossmann MG. 2009. Structural comparison of different antibodies interacting with parvovirus capsids. *J Virol* 83:5556-5566. <https://doi.org/10.1128/JVI.02532-08>.
 78. Gurda BL, DiMattia MA, Miller EB, Bennett A, McKenna R, Weichert WS, Nelson CD, Chen W-J, Muzyczka N, Olson NH, Sinkovits RS, Chiorini JA, Zolotukhin S, Kozyreva OG, Samulski RJ, Baker TS, Parrish CR, Agbandje-McKenna M. 2013. Capsid antibodies to different adeno-associated virus serotypes bind common regions. *J Virol* 87:9111-9124. <https://doi.org/10.1128/JVI.00622-13>.
 79. Tseng YS, Agbandje-McKenna M. 2014. Mapping the AAV capsid host antibody response toward the development of second generation gene delivery vectors. *Front Immunol* 5:9. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2014.00009>.
 80. Tse LV, Klinc KA, Madigan VJ, Castellanos Rivera RM, Wells LF, Havlik LP, Smith JK, Agbandje-McKenna M, Asokan A. 2017. Structure-guided evolution of antigenically distinct adeno-associated virus variants for immune evasion. *Proc Natl Acad Sci U S A* 114:E4812-E4821. <https://doi.org/10.1073/pnas.1704766114>.
 81. Lopez-Bueno A, Valle N, Gallego JM, Perez J, Almendral JM. 2004. Enhanced cytoplasmic sequestration of the nuclear export receptor CRM1 by NS2 mutations developed in the host regulates parvovirus fitness. *J Virol* 78:10674-10684. <https://doi.org/10.1128/JVI.78.19.10674-10684.2004>.
 82. Rubio MP, Lopez-Bueno A, Almendral JM. 2005. Virulent variants emerging in mice infected with the apathogenic prototype strain of the parvovirus minute virus of mice exhibit a capsid with low avidity for a primary receptor. *J Virol* 79:11280-11290. <https://doi.org/10.1128/JVI.79.17.11280-11290.2005>.
 83. Shein HM, Enders JF, Levinthal JD. 1962. Transformation induced by simian virus 40 in human renal cell cultures. II. Cell-virus relationships. *Proc Natl Acad Sci U S A* 48:1350-1357. <https://doi.org/10.1073/pnas.48.8.1350>.
 84. Lombardo E, Ramirez JC, Garcia J, Almendral JM. 2002. Complementary roles of multiple nuclear targeting signals in the capsid proteins of the parvovirus minute virus of mice during assembly and onset of infection. *J Virol* 76:7049-7059. <https://doi.org/10.1128/JVI.76.14.7049-7059.2002>.
 85. Maroto B, Ramirez JC, Almendral JM. 2000. Phosphorylation status of the parvovirus minute virus of mice particle: mapping and biological relevance of the major phosphorylation sites. *J Virol* 74:10892-10902. <https://doi.org/10.1128/JVI.74.23.10892-10902.2000>.
 86. Hernando E, Llamas-Saiz AL, Foces-Foces C, McKenna R, Portman I, Agbandje-McKenna M, Almendral JM. 2000. Biochemical and physical characterization of parvovirus minute virus of mice virus-like particles. *Virology* 267:299-309. <https://doi.org/10.1006/viro.1999.0123>.
 87. Ramirez JC, Santaren JF, Almendral JM. 1995. Transcriptional inhibition of the parvovirus minute virus of mice by constitutive expression of an antisense RNA targeted against the NS-1 transactivator protein. *Virology* 206:57-68. [https://doi.org/10.1016/S0042-6822\(95\)80019-0](https://doi.org/10.1016/S0042-6822(95)80019-0).
 88. Boissy R, Astell CR. 1985. An Escherichia coli recBCSbcBrecF host permits the deletion-resistant propagation of plasmid clones containing the 5'-terminal palindrome of minute virus of mice. *Gene* 35:179-185. [https://doi.org/10.1016/0378-1119\(85\)90170-2](https://doi.org/10.1016/0378-1119(85)90170-2).
 89. Santaren JF, Ramirez JC, Almendral JM. 1993. Protein species of the parvovirus minute virus of mice strain MVMP: involvement of phosphorylated VP-2 subtypes in viral morphogenesis. *J Virol* 67:5126-5138.

EN PREPARACIÓN

**Re-Targeting Parvovirus to the Tumor Vasculature by
Replacing Residues of Capsid Functional Domains with
VEGF-blocking Peptides**

Tania Calvo-López, Esther Grueso¹, Cristina Sánchez-Martínez¹, and José M. Almendral^{*}

Centro de Biología Molecular Severo Ochoa (CSIC-UAM),

28049 Cantoblanco, Madrid, Spain

Present address: ¹Biosciences Research Institute. School of Experimental Sciences, Universidad Francisco de Vitoria, 28223 Pozuelo de Alarcón, Madrid, Spain.

*Corresponding author. Mailing address: José M. Almendral. Centro de Biología Molecular "Severo Ochoa" (CSIC-UAM). Universidad Autónoma de Madrid. 28049 Cantoblanco, Madrid. Spain. Phone: 34-91-1964559, Fax: 34-91-1964420. E-mail: jmalmendral@cbm.csic.es.

ABSTRACT

Re-targeting oncolytic viruses to the tumour vasculature may enhance their anticancer potential and favour delivery of therapeutic genes. We have engineered by a peptide substitution approach the capsid of the parvovirus Minute Virus of Mice (MVM) attempting to re-target its oncolytic capacity against the neo-angiogenic process of tumours. Peptides (6-7 mer) at each of three MVM capsid functional domains (the dimple receptor-binding site at the 2x axis; the protruding spike, at the 3x axis; and the unordered VP2 n-terminus, at the 5x axis) were replaced by peptides (named A, N, and P) that functionally block the vascular endothelial growth factor (VEGF). Most substitutions impaired virus assembly or infectivity, but N at the dimple (Nd), P at the spike (Ps), and in combination (NdPs), yielded infectious chimeric virions. While the Ps substitution brought low infection significance, Nd-substituted virions remarkably showed increased specific infectivity as compared to wt for human U373MG glioblastoma cells. Chimeric virions failed to bind to or infect via VEGF-R1, suggesting structural distortions imposed by the orchestrated capsid assembly on the functional configuration of the inserted peptides. Instead, the Nd substitution drives the chimeric virion to bind sialic acid moieties with higher affinity than wt. Interestingly, mild alpha2,3 sialic acid removal of human cell surface with neuraminidase drastically increased Nd-virion infection, suggesting that extensive occupancy of the 2x receptor binding domain may impose capsid rigidity precluding the structural transitions required for infectious entry. This study illustrates structural constraints to re-target icosahedral viral capsids that have evolutionarily adopted narrow grooves to allocate small receptors, although the type and abundance of sialic acids on the cancer cell surface may offer opportunities to manipulate the tropism of oncolytic viruses.

IMPORTANCE

Shifting the tropism of parvovirus capsids to different cells and tissues is being extensively used in gene therapy protocols, but re-targeting to a specific receptor remains a major challenge. The anti-tumour specificity of the oncolytic MVM parvovirus is hampered by the use as receptor of sialic acid types present on the surface of many physiological cells. Aiming at MVM re-targeting to the tumour vasculature, VEGF-R1 binding peptides were inserted replacing residues at three capsid functional domains including a dimple at the twofold axis binding the sialic acid receptor. Although icosahedral capsid assembly distorted the VEGF-R1 binding capacity of the exogenous peptides, the specific infectivity of some chimeric virions for human glioblastoma could be greatly enhanced by controlled removal of sialic acid from the cell surface. Thus, viral oncotropism may be manipulated through changing the binding affinity to sialic acid types, which composition and complexity are dependent on cell type.

INTRODUCTION

Inhibiting neovascularization is a major therapeutic choice against many solid tumors. Therefore, re-targeting the tropism of oncolytic viruses to the tumor vasculature may enhance their anticancer capacities.

Viruses are being studied as biological tools to combat cancer. One promising though challenging strategy being explored, is to decorate viral particles with heterologous peptides on protein domains, in order to retarget viruses at cancer cells. A rationale design of oncotropic viruses may be feasible for capsids of which a 3-D structure is available, so protein domains exposed at their surface can be genetically engineered for this purpose. Members of the Parvoviridae, which consist of a 25 nm-diameter T=1 icosahedral nonenveloped capsid packaging a 5kb single stranded DNA genome (29), are major candidates for this kind of research, as the structure of the capsid is available to high resolution for viruses from different genera (1, 32, 26, 76, 86). Main characteristic features of the parvoviral capsid surface are a \square -cylindrical projection encircled by a canyon-like depression that surrounds the fivefold symmetry axes, a spike-like protrusion in the threefold axis, and a dimple depression at the twofold axis (76). At the center of the \square -cylinder a pore runs between the surface and the interior of the virion. The n-terminal sequences (Nt) of the capsid proteins (VP) are not ordered in any parvovirus (PV) crystal structure (27). Genetic engineering of PV capsids is however restricted by their complex structure-function relationship and the multiple roles that capsid proteins play in the parvoviral life cycle (3).

Modifications of the capsid of the Dependovirus genus members have been extensively reported with varying outcomes. Despite compromised yields and functional constraints, insertional mutagenesis of the capsid with heterologous peptides allowed the Adeno-Associated Virus (AAV) to be retargeted (85, 21, 51). The VP residue targeted by the inserted peptide influenced the exposure on the capsid surface and the effects on infectivity and viral tropism (reviewed in 57). Although the sequence of the heterologous peptides may be deleterious for particles formation, permissive sites for large insertions were identified in the Nt of the VP (84), generating recombinant AAV viruses for multiple currently ongoing gene therapy applications (reviewed in 81).

Among the autonomously replicating Parvoviridae of the Parvovirus genus, some members are of particular interest in anticancer therapies, since they exhibit oncosuppressive properties under experimental and natural settings (reviewed in 9). Although these viruses are endowed with genuine intracellular oncotropic and oncolytic features, it would be desirable if their uptake could be made specific for neoplastic cells, thereby avoiding their sequestration by normal tissues. A first attempt to retarget a member of this genus, the Feline Parvovirus (FPV), by the insertion of the RGD motif recognizing integrins at the loop 2 of the capsid surface severely impaired virus yield, although allowed moderate transduction of certain human tumor cells (47). Minute Virus of Mice (MVM), the prototype species of the Parvovirus genus (11), appears to be a prime candidate for the rational design of oncolytic virus on the basis of its antineoplastic activity (50), the extensive information accumulated on capsid determinants of tropism and pathogenicity (41, 12, 6, 58, 71) and life cycle (79), and the availability of the capsid crystal structure for the two best studied MVM strains (1, 32). The MVM native capsid is composed of about ten subunits of the larger VP-1 protein (83 kDa) and the rest of the major VP-2 protein (63 kDa) (75, 73), and the crystal structure is kept by VP2-only virus like particles (VLPs) purified from insect cells (23, 32).

Insertions of heterologous peptides engineered in the most exposed ordered surface loops of VLPs of MVM, and of the related canine parvovirus (CPV) and porcine parvovirus (PPV), were found to partly or completely impair stability and assembly (24, 7). However, the insertion of heterologous peptides at some positions of loop 2 allowed chimeric VLPs of PPV and CPV be produced in amounts enough to induce specific antibodies against the inserted epitope (66, 67). Better tolerance for peptide insertions was found across the residues constituting the unordered VP2 n-terminal sequence of CPV and PPV, which elicit protective antiviral cytotoxic responses *in vivo* although not specific anti-peptide antibodies (69, 36, 70), suggesting that the inserted peptides were not exposed at the surface of the chimeric VLP particle (89). It should be noted however that VLPs are not adequate particle entities to study PV retargeting as they assemble in the cytoplasm of insect cells (88), disregarding the relevance of nuclear transport in PV native capsid assembly (38, 37, 64).

MVM has shown important oncolytic properties toward glioblastoma and other tumor cells (refss). To enhance its oncolytic specificity, this work describes the first attempt on MVM retargeting to tumour cells. A previously described approach (ref Esther) based on replacing short amino acid sequences by VEGF blocking peptides (VEbp) was extended here to other capsid domains and additional related peptides attempting to retarget MVM infection to human glioblastoma cells. The tackled domains were: (i) at the dimple of the MVM capsid (2x axis; Refss) a small set of residues exposed on the surface play a key functional role in virus infection as they are involved in contacts with the sialic acid receptor (ref). Changes at this domain altered tropism in vitro (ref) and pathogenicity in scid mice (refs). (ii) the spike, with interdigitated residues.... the loop 4....(iii) the flexible VP2 Nt involved in entry function by exposing through a pore at the 5x axis....We proceeded to substitute residues at these MVMp capsid domains by VEbp of similar size to better preserve capsid integrity.

we have addressed a peptide replacement strategy at functional domains of MVM capsid.

RESULTS

Pleiotropic phenotypic effects of VEbp engineered at three functional domains of MVM capsid.

Substitution of wt sequences by heterologous peptides of similar size has been recently probed a better approach than mere insertions to engineer MVM capsid (Esther 2019). This peptide substitution approach was used in the present study to attempt re-targeting MVM infection to VEGF-R expressing cells. For the sake of simplicity in the nomenclature of the engineered chimeric virions, the three tackled functional domains of the capsid (Fig. 1A) and the three inserted VEGF-blocking peptides (VEbp; Fig. 1B) have been named with single letters. The entire set of genomic molecular clones containing single (e.g. Ad) or double (e.g. NdPs) peptide sequence substitutions were individually transfected in NB324K cells and analyzed for the subsequent stages of virus life cycle including VPs expression, nuclear translocation, capsid assembly, genome replication, viral genome encapsidation, virus yield, and ability to propagate infection to neighbouring cells. Representative results of these analyses are shown in Fig. 1 (panels C-H), and a summary of our findings is outlined in Table I. Expressed capsid proteins and DNA replicative intermediates accumulated in all transfections from the molecular chimeras (Fig. 1C, E). The VPs translocated to the nucleus and configured capsid epitopes, although the B7-Mab major spike conformational epitope was lost in chimeras carrying VEbp inserted at loop 4 as expected (Fig. 1D).

Chimeras bearing any of the VEbp inserted at the VP2-Nt or replacing dimple residues remarkably yielded assembled capsids, but only peptide P was tolerated at the spike in this process. Most capsid forming chimeras packaged viral genomes (Table I) as judged by 2Nt-staining (Fig. 1D), ssDNA resolution in southern-blot (Fig. 1E), and slot-blot hybridization in CsCl fractions of virus-density (Fig. 1F). Eleven chimeras formed DNA-filled chimeric virions, but eight lacked capacity to propagate as infectious virus in culture (Fig. 1H) or to initiate infection as determined by the number of VP+ expressing cells (IFU) in highly permissive NB324K cells when inoculated as CsCl-purified particles (Fig. 2A). The hampered infectivity of the An-inserted series of virion may be accounted by a failed VP2-Nt externalization as described (refs), whereas the non-infectious dimple chimeras suggests binding or entry defects in cells otherwise expressing the VEGF-R1 (Fig 4?), and were therefore not further studied. In summary, chimeric MVM virions fulfilling infection criteria were the Nd (bearing the N peptide in the dimple), the Ps (bearing the P peptide in the spike), and the NdPs double chimera.

VEbp substitution of dimple and spike residues impacts MVM specific infectivity.

The three VEbp-MVM chimeric virions showing significant capacity to infect were studied in depth for infection and tropism features as compared to the wtMVMp. For this, highly purified DNA-filled virions were first tested in their hemagglutination and infection capacities. Normalized amounts of HAU were directly stained for protein content (Fig. 2B) and developed by western-blot (Fig. 2C). The specific hemagglutination capacity of the chimeric virions (Fig. 2E) was several folds lower than that of wt, suggesting that both dimple and spike may be involved in erythrocyte binding. To study infectivity features virions were inspected in their plaque morphology by Coomassie-blue and anti-VPs antibody stainings of inoculated monolayers (Fig. 2E). Although similar in lytic character, the plaque size was slightly smaller for the Nd in respect to that of the wt virion, whereas Ps plaques were significantly smaller, and NdPs formed tiny plaques only detectable by the anti-VPs antibody staining. Plaque phenotype reflects restriction in the capacity of the chimeras to spread to neighbouring cells, which presumably resulted from an additive impaired capsid assembly caused by the exogenous peptide substitutions in the dimple and the spike. The specific infectivity of the chimeras, as determined by a PFU assay (using the anti-VPs antibody stainings method) with normalized amounts of virions, was twenty folds lower for the single chimeras (Ps and Nd), and two logartimic units for the double PsNd chimera, in respect to that of the wtMVM (Fig. 2F). The parallel binding defect and reduced plaque size (Fig. 2D, E) may contribute to the characteristic lower specific infectivity of the chimeras. As expected, the B7-Mab neutralized the infectivity (measured as non-structural NS1 protein expressing cells) of the Nd but not the Ps and PsNd chimeras harbouring substitutions at the epitope bound by this Mab (refs) (Fig. 2G).

The N peptide inserted at the dimple increases MVM tropism for human glioblastoma cells.

Human gliomas normally express VEGFR (refs), therefore it was of interest to study whether the VEbp substitutions alter the natural MVM tropism to glioblastoma (refs) by determining the specific infectivity of the chimeras towards the U373MG human glioblastoma cell line in respect to the reference NB324K human fibroblasts. For this, cell monolayers were inoculated in parallel with graded HAU amounts of purified virions and infection scored at 24 hpi by IF with specific antibody as the percentage of NS1 expressing cells. The results (Figure 3A, a representative example in panel 3B) showed a similar NB324K/U373MG relative infectivity of the wtMVM and of the Ps chimera, in sharp contrast to the Nd and NdPs chimeras which infected U373MG with substantially higher relative capacity. The study was supported by an analysis of virus progression days in cultures of both cell types infected at low MOI. A quantitative measurement of infection by IF-staining with the anti-VPs antibody showed that wtMVM progression in NB324K cells was several folds higher than that of the Nd chimera (Fig. 3c, upper), whereas in U373MG cells infection by the Nd chimera progressed to levels comparable to that of the wtMVM (Fig. 3c, lower). These experiments demonstrated an increased tropism of the Nd chimeric virus for human glioblastoma cells in respect to that of the wtMVM.

VEbp-MVM chimeric virus infection is not related to VEGF-R1 binding.

We next sought whether the altered tropism of Nd for glioblastoma cells was related to the use of the VEGF-R1 as receptor for the virus through the N peptide inserted at the dimple. For this, we first analyzed the expression of VEGF-R1 in cells susceptible to MVMp infection. As shown in Fig. 4A, significant accumulated levels of VEGF-R1 were detected in human NB324K transformed fibroblasts and the U373MG glioblastoma cell line, but not in the A9 mouse fibroblast cell line. In spite of the VEGF-R1 null phenotype, the A9 mouse fibroblasts were susceptible to Nd infection to levels comparable to the fully permissive NB324K cell line (Fig. 4B). We therefore concluded that the Nd chimera does not use VEGF-R1 as receptor to infect.

A possible Nd/ VEGF-R1 non-productive binding was next sought using soluble VEGF-R1 (sVER1) as competing decoy. In the conditions of the assay, purified wtMVM and chimeric virions quantitatively bound to NB324K and U373MG cells (Fig. 4C). A high excess of sVER1 added during virus adsorption did not significantly decrease the amount of wtMVM and Nd virion binding (Fig. 4C), in spite of the sVER1 effective binding capacity to VEGF in solution (Fig. 4D) and to cell surface (Fig. 4E). In consistency with above, an excess of sVER1 neither prevent wt nor Nd infection (Fig. 4F) see when NA treatment in Fig. 4G is commented. A protein species (named VP*) detected in uninfected cells upon culturing in some sera batches originated from Bovine Parvovirus capsid proteins (see...), but it did not affect MVM binding. Therefore VEbp-Nd and -Ps chimeric virions fail to bind to VEGF-R1 on the cell surface.

wtMVM and Nd virions differ in the sialic acid requirement for binding to cell surface.

As possible mediator of cell recognition by VEbp chimeric virions, we next focused on the involvement of sialic acid (sia), as MVM uses as primary receptor molecules with sia-terminal residues (Refs) being the dimple the binding domain of the capsid allocating this sugar (Lopez-Bueno et al., 2006). As Nd virion carrying VEbp-substituted dimple retains the ability to infect different cell types, it was of interest to study first whether sia was involved in the Nd-cells interaction. This analysis was performed removing sia moieties from the cell surface with graded amounts of two types of neuraminidases. Incubation NB324K cells with the α 2-3 Neuraminidase S (2,3NA) catalyzing the hydrolysis of α 2-3 linked N-acetylneuraminic acid residues (Ref), drastically reduced the binding capacity of the wtMVM virion in a dose dependent manner (Fig. 5A, left). Likewise, the Nd binding to NB324K cells was suppressed by this enzyme. Incubation with the α 2-3,6,8 Neuraminidase (2,3,6,8NA) catalyzing the hydrolysis of α 2-3, α 2-6, and α 2-8 linked sialic acid residues (ref) also efficiently prevented wt virion binding since the lower tested doses (Fig. 5A, right). In sharp contrast, the Nd virion efficiently bound to (2,3,6,8NA)-treated cells, and the binding only significantly declined at the highest

tested dosis. This analysis was supported by an assay performed with ³⁵S-labeled purified empty capsids. Labeled capsids applied following incubation with graded amount of the 2,3,6,8NA confirmed the distinct binding properties of the wt and Nd virions to the surface of NB324K cells treated with this enzyme (Fig. 5B).

To extend the study to other cell type of higher oncolytic relevance, the binding assays were performed under similar conditions with U373MG human glioblastoma cell line. In this transformed cell type, the wtMVM and Nd virion binding was similarly impaired upon incubation with the 2,3NA (Fig. 5C, left), whereas Nd binding capacity remained at levels significantly higher than that of wt virions in cells treated with the 2,3,6,8NA (Fig. 5C, right). Therefore, the U373MG binding assays paralleled the findings obtained in NB324K cells. These experiments suggested that the wtMVM and the Nd chimera use different type(s) of sia-moities for binding to cell surfaces.

Limited removal of sialic acid sharply increases Nd infection of human transformed cells.

We finally analyzed the impact of sia removal of cell surface on wtMVM and Nd infection. Initial trials suggested that Nd infection was not sia-dependent, in accordance to the substitution of the wt residues conforming the major MVM tropism determinant in the dimple (ref). However, careful analysis of the Nd infection uncovered a more complex scenario. The progressive removal of alpha 2,3 linked sia from the NB324K cell surface with the 2,3NA determined a parallel decrease in the wtMVM infection capacity as quantitated by the level of NS1 expression (Fig. 6A). However, the two lower NA doses tested (0,6 and 1,3 U/microl) induced a remarkably twofold increase in the Nd infection levels. The treatment with the 2,3,6,8NA similarly hampered wtMVM and Nd infection in a dose-dependent manner as determined by NS1 western-blot (Fig. 6B, left) and supported by cytometry (Fig. 6C). But a careful analysis performed at mild NA treatment across the 0-40 U/microl interval uncovered, as above, a progressive increase in Nd infection up to ten folds at the lower tested doses (1,3 to 5 U/microl), before sharply declining since 10 U/microl (Fig. 6B, right). A benefit on wtMVM infection at the lower NA doses was however not appreciated.

Finally, the study on sia-dependence for infection was extended to U373MG glioblastoma cells. In this cell system, the wtMVM infection sharply declined as alpha-2,3 linked sia moities were removed by the 2,3NA. The Nd infection was also hampered at high doses to an apparent lower extent, but the low dosis 0,6 U/microl suggested a benefit for the infection (Fig. 6D, left). A careful analysis performed at across a range of low doses (0-1,2 U/microl) evidenced a remarkable distinct sensitivity to sia removal. While wt infection declined to background levels since the 0.15 U/microl dosis, the level of NS1 expression in Nd infection raised tenfold as cells were treated with increasing amounts of 2,3NA (Fig. 6D, right). The benefit on Nd infection at low NA doses was also consistently observed in U373MG cells treated with the 2,3,6,8NA (Fig.6E). The lower sensitivity to this NA of the Nd infection in respect to wt infection (Fig.6E, left), as well as the tenfold increase in Nd infection at low doses (Fig. 6E, right), confirmed a distinct usage of sia-linked receptor(s) by the wt and the Nd virions to infect U373MG cells as well.

DISCUSSION

The relevance of VEGF in neovascularization of tumours fundamentals current clinical cancer therapies and is prompting multiple anti-VEGF experimental approaches including those based in viral oncolysis (ref). We have attempted to re-target the parvovirus MVM, a recently reputed oncolytic virus with inherent anti-glioblastoma and other tumours potency (Gil-Ranedo 2021), to the tumour vasculature by engineering its capsid with VEGF-R1 binding peptides.

Peptide replacement as methodology to bypass capsid structural restrains. The exquisite structure-function properties of icosahedral capsids, configured through multiple inter and intra subunits contacts of residues, make uncertain the structural tolerance and biological consequences for the virus life cycle of a given exogenous peptide sequence. Not surprising, the T1 parvovirus capsid showed severe restrictions to exogenous peptide insertions (ref), although some peptides were successfully inserted at certain capsid domains (refs). To circumvent this structural restriction, we undertook a peptide substitution approach, in which short peptides sequences at three MVM functional domains were replaced by VEGF-R1 binding peptides. This approach illustrated a remarkable tolerance of capsid assembly to substitutions of the dimple (a 2x axis) residues by the three (P,A,N) peptides, which may explain why this domain evolves in vivo to MVM pathogenic variants in the mouse infection (Ref). The tolerance to peptide substitution at the 3x axis however was narrower, as only the P peptide allowed efficient capsid assembly. The VP subunits interdigitate to configure the loop four of the spike (ref), and only the residues of peptide P including prolines may confer proper contacts at that domain. A previous report demonstrated though that the virus may evolve and overcome assembly defect caused by peptide A substitution at this site (ref). Finally the insertion (though not substitution) of peptide A at the Nt highly flexible domains of the VP1 and VP2 subunits, which indeed are not resolved in the crystal structure (ref), yielded assembled virions devoid of infectivity, as these flexible domains must be exposed through the 5x pore to initiate infection (Ref). This infection defect could not be rescued by any of the three (P, A, N) peptides substituting dimple residues (Table I). Importantly, virions carrying the P, N, or the A peptide in the dimple, as well as the P peptide in the spike, were unable to bind to VEGF-R1 in cells and added in solution (Fig. 4,5), in spite of the inherent high binding affinity to VEGF-R1 of these peptides (ref). Therefore, the capsid assembly process distorts the functional configuration of these exogenous peptides. This conclusion may well explain the common failure of re-targeting parvoviruses by rational design through exogeneous peptides.

It is intriguing that none of the exogeneous peptides drove MVM to bind VEGF-R1. Chimeric Nd virus switched tropism and bound to cell surface by other unknown component, but infection was driven through sialic acid receptors. These data illustrate how parvovirus re-targeting to different cell type or tissue may involve unsuspected receptors distinct from the original targeting purpose.

For example the extensive engineering of tissue tropism variants of AAV with unclear receptor usage in vivo.

MVM tropism shift was not due to an extended recognition of the VEGF-R1. Nd-virions bound to a cell-surface component distinct from the type of sialic acid(s) recognized by the wt virus. Thus, even after three different peptide combinations, the VEGF-blocking peptides were unable to drive an infectious binding to the VEGF-R1 receptor, suggesting that the narrow configuration of the dimple may strictly limit infectious binding through small sugar moieties.

Perhaps the dimple, so narrow, can only bind sialic acid ... very difficult to predict the type of contact of amino acids with sialic, also sialic is everywhere, for both reasons re-targeting MVM may be enormously complicated through the dimple.

Sialic acid complexity in productive and non-productive binding. The complexity of sialic trees and productive infection. If you remove sialic acid, the wt virus continues to bind, but no longer infects. In the Nd interaction, most binding sites are already abortive, without the sialic being involved in those binding, and in both cell types. This suggests that both viruses share an independent sialic non-productive route of entry. But the proportion of Nd virions that find the productive binding pathway are substantially increased by eliminating part of the complexity of the sialic trees, suggesting binding

receptors and pseudo-receptors which composition may be cell-dependent. (to relate it to Polyomavirus binding to s sugars; and moreover to mutant I362S (REf), which a lower affinity for sialic made it more infectious in vivo!). This phenomenon is specific to dimple, it is not observed in the Ps chimera, so the spike does not seem to be involved in determining the route of virus entry.

Different sialic acid types for MVMP and MVMI viral strains (ref).

But Nd infects U373 relatively better than NB324K, through sialic junctions. This suggests that it may be possible to modify the tropism in some way, although hardly rational design, so that the use of sialics alters the tropism of the virus. Random libraries, but not rational design, may have a chance to find functional peptides for a given receptor.

Concluding Remarks. Our study lays the structural bases for future manipulations of the Parvovirus capsid by exogenous peptides substitutions. However, at certain domains and using certain peptides, with a degree of structural analogy of the domain to be replaced, for example P peptide has many prolines and it was well-tolerated in the loop 4 of the spike that also has them, while the dimple tolerates a greater diversity of residues (ver antes). Receptors other than sialic seem difficult to use through the dimple productive binding, but they could reduce the non-productive binding of many vectors, increasing their transduction efficiency. The tropism of icosahedral viruses may therefore be engineered through modulation of the natural receptor binding domain. The genetic manipulation of MVM capsid offers therefore promising avenues to explore a rational design of oncotropic icosahedral viruses. Our study illustrates the complexity of manipulating structured domains of icosahedral capsids for retargeting purpose and cancer cells infectious recognition

MATERIALS AND METHODS

Cells

The NB324K simian virus 40-transformed human newborn kidney cell line (83) was maintained in Dulbecco's modified Eagle medium (DMEM) supplemented with 5% (Gibco BRL). For routine transfections 3×10^6 cells were electroporated with 10 μ g of plasmid following a previously described method (84), but the growth of chimeric viruses usually required transfection at large scale (52).

Construction of the MVM-VEbp chimeras.

The prototype strain (p) of the Protoparvovirus Minute Virus of Mice (Refss) was used in this study. The constructs were carried out in the common region of the VP1 and VP2 capsid proteins and involved the substitution of the corresponding wtMVMp sequence for that of small 6-7 mer VEbp peptides, with the exception of a deletion in the dimple and the N-terminus of VP2 and VP1 sequences into which the peptides were inserted without substituting wt sequences. (I) To construct the chimeras at the 2fold-axis or dimple (the s series of chimeras) of the MVMp capsid, the peptides P (PQPRPLC), N (NIRRQG) and A7R (ATWLPPR) were inserted substituting the wt sequence between amino acids I362 and K368 of VP2 (both included). For this, the following oligonucleotides were designed (5' to 3'): VEG3 (AACACTGCCATTGGCTTCATCTGCTGGAACCTTTGG), and VEG4 (CCAAAAGTTCCAGCAGATGAAGCCAATGGCAGTGTT), were used to construct the delta dimple chimera (I362 to K368 residues, nt 3876-3898); VEG3A (CAGTGGGCGTGGCTGTGGATCTGCTGGAACCTTTGG) and VEG4A (CCACAGCCACGCCCACTGGAAGCCAATGGCAGTGTT) to insert the P peptide, VEG3B (GCCCTGGCGGCGGATGTTATCTGCTGGAACCTTTGG) and 4B (AACATCCGCCCGCCAGGGCGAAGCCAATGGCAGTGTT) to insert the N peptide, and VEG3C (CCTCGGCGGCAGCCACGTGGCATCTGCTGGAACCTTTGG) and 4C (GCCACGTGGCTGCCGCCGAGGGAAGCCAATGGCAGTG) to insert the A peptide at this domain of the capsid. (II) The construction of the chimeric viruses carrying substitutions at the spike and the insertion of the peptide A at the VP-Nt sequence has been previously described (Ref and Ref, respectively). (III) Double chimeras at the dimple and the spike were constructed using the modified oligonucleotides VEG5A (CAGTGGGCGTGGCTGAGGGTTTGCATTTGTAAGAATG) and VEG6A (CCTCAGCCACGCCCACTGGACATTCATTTTTCAAATG), in addition to the flanking VEG1 GGGGAATTCGCTCAAGGGAGCAGACATGG (3721-3740nt of MVM genome, containing an inserted EcoRI restriction site at the 5' end), and VEG2 (GTAACAATTCTAGAAAGTGTGGCTCCG, 4329-4355 nt of MVM genome). The modified plasmids with the three exogenous peptides at the dimple were used as template to perform the PCR. And (IV) double chimeras at the dimple and the VP-Nt sequence (An) were constructed by cloning the PCR fragment obtained with the A peptide in the pP, pA, pN plasmids, restricting with the *Xho*I y *Hpa*I enzymes and ligated to obtained the pAP/AN/AA plasmids.

The pSVtk-VPs plasmid (ref) was used as template in the constructs replacing the corresponding wt sequences by digestion with appropriate restriction enzymes and then cloned into the pMM984 infectious plasmid (ref). Flanking oligonucleotides used in 5' and 3' extremes were S1 5'GGGGAATTCGCTCAAGGGAGCAGACATGG3' and S2 5'GTAACAATTCTAGAAAGTGTGGCTCCG3', corresponding with 3721-3740 nucleotides with a EcoRI site inserted upstream to 3721 nucleotide, in the case of S1 primer, and nucleotides 4329-4355 of MVM genome sequence, in the case of S2 primer. High fidelity Platinum®Pfx (Invitrogen) and Pwo (Roche) polymerases with the PCR programs according with manufacturer were used. Conditions were (in brief): en el caso de la Pwo, se utilizó 0,5 μ g de ADN plasmídico de molde, dNTPs (200 μ M), los oligonucleótidos modificados (2 μ M) y 2,5 U de polimerasa. Las condiciones de la primera PCR fueron: 2' a 94 °C (1 ciclo); 15'' 94 °C, 30'' 55 °C y 1'30'' a 72 °C (10 ciclos); 2' 94 °C (1 ciclo); 15'' 94 °C, 30'' 55 °C y 1'30'' a 72 °C (con incrementos de 5'' en cada ciclo) (20 ciclos); 7' 72 °C (1 ciclo) y 5 °C. Tras esta primera PCR, se limpiaron las bandas (*Wizard® SV Gel and PCR Clean-Up System*, Promega) y se usaron como molde (1 μ l) para la segunda PCR: 2' 94 °C (1 ciclo); 15'' 94 °C, 30'' 60 °C y 1'30'' 72 °C (10 ciclos) y se añadieron los oligonucleótidos flanqueantes (2 μ M) y de nuevo: 2'94 °C (1 ciclo);

15'' 94 °C, 30'' 60 °C, 1'5'' 72 °C (con incrementos de 5'' en cada ciclo) (20 ciclos); 7' 72 °C (1 ciclo) y 5 °C. Restriction enzymes (Roche) were used for 1h at 37 °C, and Tu DNA ligase (New England Biolabs) for 14h at 15 °C. Genomic plasmids were grown from a single transformed colony of *Escherichia coli* JC8111, a bacterial strain that permits deletion-resistant propagation of MVM plasmid clones bearing terminal palindromes (88), and sequenced in all cases by Sanger sequencing to verify the specific genetic constructions as well as to verify the absence of additional mutations. Plasmids were purified at large scale with Qiagen Plasmid Maxi kit (Qiagen) kits using the manufactured protocol.

Wt and chimeric viral stocks. Viral stocks of MVMp and chimeric viruses were harvested 48 h post-transfection (hpt) and purified from cellular pellets by sucrose cushions and cesium chloride equilibrium centrifugation as previously described (REFfss). Viral particles in fractions corresponding to the density of DNA-filled virus were pooled, dialyzed against PBS, and kept at -70 °C in aliquots. In case of limiting amounts, the chimeric DNA-filled virus preparations were concentrated by centrifugation at 4 °C in Amicon Ultra-15 filters (Millipore) as recommended by the manufacturer.

Virus titration.

Infectious viruses were titrated by a standard PFU assay as described (ref). In brief, NB324K cell monolayers seeded 24 h before at a density of 220,000 cells/P60 plate were infected with serial virus in 400 µl per P60, diluted in PBS with 0.1% FCS. After one hour of virus adsorption at 37 °C with gentle shaking, the inoculum was removed and 7 ml of plating medium (DMEM 10% FCS, 0.6% LM-GQT agarose (Pronadisa) equilibrated at 37 °C) was added. The plates were fixed 6 days after incubation in 10% formaldehyde (Panreac) in PBSi and stained with 0.2% crystal violet in 10% formaldehyde in PBSi.

HAU. Adult mouse blood was used for the MVM haemagglutination (HA) assay as described (ref). The blood was washed three times with PBSi, collecting the erythrocytes by centrifugation at 1500 rpm for 5 min. After the washes, the 50% (v / v) erythrocyte pellet was resuspended in PBSi and stored at 4 °C until use. HA was carried out in U-profile microtest plates (Nunc). The samples to be evaluated were applied in a final volume of 100 µl in PBSi and serial dilutions were made 1: 2 in PBSi. Finally 50 µl of 2% erythrocytes in PBSi were added to each well, the plate was gently shaken and kept at 4 °C in the dark for at least two hours.

IFU. An IF method was used to compare the tropism of the viruses. Monolayers of NB324K and U373MG grown on coverslips were inoculated in parallel with serial dilutions of the wt and chimeric viruses. Cells were fixed 24 hpi and stained for NS1 expression by IF. The number of IFU was determined as described (ref) by determining the number of VP+ expressing cells (IFU) as previously described (REFfss).

Antibodies.

The MVM antibodies used in this work have been previously described: the □-VPs rabbit polyclonal antiserum was raised in rabbit against denatured VP2 and used for the general localization of the VP1 and VP2 proteins independently of the configuration (65); the B7 mouse monoclonal antibody (B7-Mab) that recognizes an epitope configured by intact empty capsid and DNA-filled virus localized at the 3-fold axes (58, 59) but fails to react with isolated VP subunits or trimers (28, 66); and the □-MVM antibody raised in rabbit against native capsid and used to recognize mainly conformational epitopes (67, 89).

Specific antibodies of the VEGF system were: the □-P6L rabbit polyclonal antibody was raised against the 12-mer PQRPLPQPRPL peptide sequence (a dimer of the P6L peptide) coupled to KLH and administered by injection (100 µg per dose) a first dose emulsified in Freund's complete adjuvant followed by two boost injections in incomplete adjuvant. Bleeding was done ten days after the last injection, and the serum was affinity-purified (NAbTM protein G, Thermo); the □-A7R antibody corresponds to a commercial □-VEGF mouse monoclonal (Sigma, V4758) that binds human native VEGF and neutralizes its biological activity. This antibody was used to identify by phage display the 7-mer ATWLPPR anti-angiogenic A7R peptide binding neuropilin-1 (13). Recombinant biologically active human VEGF-A (Peprotech 100-20) was used to control the □-A7R antibody activity.

Immunological methods.

Double-label indirect immunofluorescence (IF) was performed with cells seeded onto glass cover slips following described protocols (ref). Secondary antibodies (Invitrogen, 1/1000 dilution) were a \square -rabbit IgG conjugated to Texas red (TXRD), and an $\square\square\square$ mouse IgG conjugated to fluorescein isothiocyanate (FITC). Samples were inspected by epifluorescence in a Quantitative data were scored from multiple fields of cells in independent infections.... For Western-blotting, protein samples were denatured by boiling for five minutes in loading buffer (glycerol 10% v / v (Merck), SDS 2.3% w / v, β -mercaptoethanol 5% (Merck), bromophenol blue 0.002 % (Merck) in 0.5 M Tris-HCl pH 6.3 with 0.4% SDS), and separated by electrophoresis on denaturing gels of 8% polyacrylamide (SDS-PAGE). Electrophoresis were carried out in Tris-Glycine buffer four three hours at 85 V in minigels (10x10x0.1 cm) with molecular weight markers (precision plus protein dual color standards, Biorad). Samples were transferred to nitrocellulose (Schleicher and Schuel) in transfer buffer (25 mM Tris base, 192 mM Glycine, 0.1% SDS and 20% methanol) for one hour at 100 V (Trans-blot Electroforetictransfer Cell, Biorad). The membrane was hydrated in TBS-T buffer (Tris pH 7.5 20 mM, 140 mM NaCl, 0.1% Tween 20), blocked in TBS-T 10 % FCS, and incubated with the primary and secondary specific antibodies diluted in TBS-T 1%FCS, 1%NP40 overnight in the cold room. After thorough washing, samoples were developed with the ECL system (Enhanced Chemiluminiscence, Amersham) following the manufacturer's recommendations. For quantitation of VPs signals, films were scanned with a densitometer (Bio-Rad GS-900TM), and the relative band intensities determined with Image Lab (Bio-Rad vs.5.2). For immunoprecipitation (IP), samples were prepared in the corresponding antibody was added and samples were incubated at 4 °C overnight.150 μ l of 10% Sepharose in PBS was added and upon 2h incubation at 4 ° C under shaking the sepharose was washed three times with excess PBS,and Laemli buffer was added on the pellets to be analyzed by western blot.

Viral DNA analysis.

A DNA slot-blot method was used to quantitate the number of viral particles in purified stocks of wt and chimeric viruses as described (ref). In brief, samples were applied over nitrocellulose filters using slot blot filtration manifolds (Hoeffler) and DNA was denatured by alkaline treatments and it was bound to the membrane by heating at 80 °C for 2h. Filters were hybridized under high stringency conditions (ref) with a full-length MVM probe ³²p-labeled by random priming as described (ref). For the analysis of viral DNA replicative intermediate intermediates, a Southern-blot was used. Low molecular weight DNA was obtained by the modified method of Hirt (28) with carrier tRNA to ensure recovery (ref), electrophoresed 2-3 hours at 60V on a 0.8% agarose gel (Gibco) in Tris-Boric-EDTA buffer (45mM Tris-borate, 1mM EDTA) and transferred to Nylon membranes (Hybond-N +, Amersham Pharmacia) by means of the semi-dry system (Bio-Rad) at 3.5mA / cm² for 15 minutes. The membranes were washed with sodium citrate buffer (0.3M NaCl and 0.03M sodium citrate), denatured with 0.5N NaOH for 5 minutes and neutralized with 0.5M Tris-HCl pH 7.5, and the DNA fixed with UV light (GS Gene Linker, Bio-Rad) or by heating at 80 °C for 2 hours in oven. DNA in the membranes was hybridized to a specific probe for the viral genome constructed with the DIG High Prime DNA Labeling and Detection Starter Kit II from Roche, following the protocol according to the manufacturer's recommendations.

Virus genome replication was monitored by Southern-blot using 1% agarose gels loaded with low-molecular DNA (84) obtained from electroporated NB324K cells. Samples were alkali-blotted to filters and hybridized with a MVM full-length probe labeled by random priming using DIG High Prime DNA Labeling and Detection Starter kit II (Roche Applied Science) according with manufactured protocol.

Flow Cytometry. Cells were fixed in suspension with 4% PFA for 10 min in the dark with regular shaking, and then permeabilized for 10 min with PBS- 0.1%. Triton X-100. Cells were blocked in PBS, 0.1% Triton X-100 and 1% FBS for 20 min at room temperature under stirring, and subsequently stained with the primary and secondary antibodies in the same buffer for one hour and at 37 °C each. After extensive washing in PBS, the cells were resuspended in PBS supplemented with 20% FBS and analyzed through a FACSCanto II Flow Cytometer using a minimum of 20,000 events for each sample. Cell debris was excluded from the analysis after delimiting cell regions based on FSC and SSC parameters indicating cell size and complexity respectively. The data obtained were analyzed with the help of the FlowJo software (vs)

ACKNOWLEDGMENTS

TC-L, EG and CS-M equally contributed to this work. We are indebted to P. Tattersall (Yale University, CT) for generously providing the original pMM984 molecular clone of MVMP. TC-L was the recipient of a contract from Comunidad de Madrid (PEJ16/MED/AI-0818). This work was supported by the grants Contract QLK3-CT-2001-01010 (European Commission), S2013/ABI-2906-FEDER (Comunidad de Madrid), SAF2015-68522-P-MINECO/FEDER,UE, and (Spanish Ministerio de Economía y Competitividad and Ministerio de Ciencia, Investigación y Universidades), to JMA. The Centro de Biología Molecular "Severo Ochoa" (CSIC-UAM) is in part supported by institutional grants from the Fundación Ramón Areces and Banco Santander.

REFERENCES

- Agbandje-McKenna M, Llamas-Saiz AL, Wang F, Tattersall P, Rossmann MG. 1998. Functional implications of the structure of the murine parvovirus, minute virus of mice. *Structure* 6:1369 -1381. [https://doi.org/10.1016/S0969-2126\(98\)00137-3](https://doi.org/10.1016/S0969-2126(98)00137-3).
- Almendral JM. 2013. Assembly of simple icosahedral viruses. *Subcell Biochem* 68:307-328. https://doi.org/10.1007/978-94-007-6552-8_10.
- Arulanandam R, Batenchuk C, Angarita FA, Ottolino-Perry K, Cousineau S, Mottashed A, Burgess E, Falls TJ, De Silva N, Tsang J, Howe GA, Bourgeois-Daigneault M-C, Conrad DP, Daneshmand M, Breitbart CJ, Kirn DH, Raptis L, Sad S, Atkins H, Huh MS, Diallo J-S, Lichty BD, Ilkow CS, Le Boeuf F, Addison CL, McCart JA, Bell JC. 2015. VEGF-mediated induction of PRD1-BF1/Blimp1 expression sensitizes tumor vasculature to oncolytic virus infection. *Cancer Cell* 28:210 -224. <https://doi.org/10.1016/j.ccell.2015.06.009>.
- Asokan A, Conway JC, Phillips JL, Li C, Hegge J, Sinnott R, Yadav S, DiPrimio N, Nam HJ, Agbandje-McKenna M, McPhee S, Wolff J, Samulski RJ. 2010. Reengineering a receptor footprint of adeno-associated virus enables selective and systemic gene transfer to muscle. *Nat Biotechnol* 28:79 -82. <https://doi.org/10.1038/nbt.1599>.
- Bell J, McFadden G. 2014. Viruses for tumor therapy. *Cell Host Microbe* 15:260 -265. <https://doi.org/10.1016/j.chom.2014.01.002>.
- Binétruy-Tournaire R, Demangel C, Malavaud B, Vassy R, Rouyre S, Kraemer M, Plouët J, Derbin C, Perret G, Mazié JC. 2000. Identification of a peptide blocking vascular endothelial growth factor (VEGF)-mediated angiogenesis. *EMBO J* 19:1525-1533. <https://doi.org/10.1093/emboj/19.7.1525>.
- Bloom ME, Best SM, Hayes SF, Wells RD, Wolfenbarger JB, McKenna R, Agbandje-McKenna M. 2001. Identification of Aleutian mink disease parvovirus capsid sequences mediating antibody-dependent enhancement of infection, virus neutralization, and immune complex formation. *J Virol* 75:11116 -11127. <https://doi.org/10.1128/JVI.75.22.11116-11127.2001>.
- Boissy R, Astell CR. 1985. An *Escherichia coli* recBCSbcBrecF host permits the deletion-resistant propagation of plasmid clones containing the 5'-terminal palindrome of minute virus of mice. *Gene* 35:179 -185. [https://doi.org/10.1016/0378-1119\(85\)90170-2](https://doi.org/10.1016/0378-1119(85)90170-2).
- Boisvert M, Bouchard-Lévesque V, Fernandes S, Tijssen P. 2014. Classic nuclear localization signals and a novel nuclear localization motif are required for nuclear transport of porcine parvovirus capsid proteins. *J Virol* 88:11748 -11759. <https://doi.org/10.1128/JVI.01717-14>.
- Carmeliet P, Jain RK. 2011. Molecular mechanisms and clinical applications of angiogenesis. *Nature* 473:298 -307. <https://doi.org/10.1038/nature10144>.

Carreira A, Menendez M, Reguera J, Almendral JM, Mateu MG. 2004. In vitro disassembly of a parvovirus capsid and effect on capsid stability of heterologous peptide insertions in surface loops. *J Biol Chem* 279: 6517- 6525. <https://doi.org/10.1074/jbc.M307662200>.

Cotmore SF, Agbandje-McKenna M, Chiorini JA, Mukha DV, Pintel DJ, Qiu J, Soderlund-Venermo M, Tattersall P, Tijssen P, Gatherer D, Davison AJ. 2014. The family Parvoviridae. *Arch Virol* 159:1239 -1247. <https://doi.org/10.1007/s00705013-1914-1>.

Crawford LV. 1966. A minute virus of mice. *Virology* 29:605- 612. [https://doi.org/10.1016/0042-6822\(66\)90284-4](https://doi.org/10.1016/0042-6822(66)90284-4).

Dings RP, Vang KB, Castermans K, Popescu F, Zhang Y, Oude Egbrink MG, Mescher MF, Farrar MA, Griffioen AW, Mayo KH. 2011. Enhancement of T-cell mediated antitumor response: angiostatic adjuvant to immunotherapy against cancer. *Clin Cancer Res* 17:3134 -3145. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-10-2443>.

Ferrara N, Adamis AP. 2016. Ten years of anti-vascular endothelial growth factor therapy. *Nat Rev Drug Discov* 15:385- 403. <https://doi.org/10.1038/nrd.2015.17>.

Gardiner EM, Tattersall P. 1988. Mapping of the fibrotropic and lymphotropic host range determinants of the parvovirus minute virus of mice. *J Virol* 62:2605-2613.

Gavilondo JV, Hernández-Bernal F, Ayala-Ávila M, de la Torre AV, de la Torre J, Morera-Díaz Y, Bequet-Romero M, Sánchez J, Valenzuela CM, Martín Y, Selman-Housein KH, Garabito A, Lazo OC, CENTAURO Group of Investigators. 2014. Specific active immunotherapy with a VEGF vaccine in patients with advanced solid tumors. Results of the CENTAURO antigen dose escalation phase I clinical trial. *Vaccine* 32:2241-2250. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2013.11.102>.

Geletneky K, Hajda J, Angelova AL, Leuchs B, Capper D, Bartsch AJ, Neumann JO, Schöning T, Hüsing J, Beelte B, Kiprianova I, Roscher M, Bhat R, von Deimling A, Brück W, Just A, Frehtman V, Löbhard S, Terletskaia-Ladwig E, Fry J, Jochims K, Daniel V, Krebs O, Dahm M, Huber B, Unterberg A, Rommelaere J. 2017. Oncolytic H-1 parvovirus shows safety and signs of immunogenic activity in a first phase I/IIa glioblastoma trial. *Mol Ther* 25:2620 -2634. <https://doi.org/10.1016/j.ymthe.2017.08.016>.

Gil-Ranedo J, Hernando E, Riobos L, Domínguez C, Kann M, Almendral JM. 2015. The mammalian cell cycle regulates parvovirus nuclear capsid assembly. *PLoS Pathog* 11:e1004920. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1004920>.

Gil-Ranedo J, Hernando E, Valle N, Riobos L, Maroto B, Almendral JM. 2018. Differential phosphorylation and N-terminal configuration of capsid subunits in parvovirus assembly and viral trafficking. *Virology* 518: 184 -194. <https://doi.org/10.1016/j.virol.2018.02.018>.

Giordano RJ, Anobom CD, Cardó-Vila M, Kalil J, Valente AP, Pasqualini R, Almeida FC, Arap W. 2005. Structural basis for the interaction of a vascular endothelial growth factor mimic peptide motif and its corresponding receptors. *Chem Biol* 12:1075-1083. <https://doi.org/10.1016/j.chembiol.2005.07.008>.

Giordano RJ, Cardó-Vila M, Lahdenranta J, Pasqualini R, Arap W. 2001. Biopanning and rapid analysis of selective interactive ligands. *Nat Med* 7:1249 -1253. <https://doi.org/10.1038/nm1101-1249>.

Girod A, Ried M, Wobus C, Lahm H, Leike K, Kleinschmidt J, Deleage G, Hallek M. 1999. Genetic capsid modifications allow efficient re-targeting of adeno-associated virus type 2. *Nat Med* 5:1438. <https://doi.org/10.1038/71021>.

Guetta E, Graziani Y, Tal J. 1986. Suppression of Ehrlich ascites tumors in mice by minute virus of mice. *J Natl Cancer Inst* 76:1177-1180.

Gurda BL, DiMattia MA, Miller EB, Bennett A, McKenna R, Weichert WS, Nelson CD, Chen W-J, Muzyczka N, Olson NH, Sinkovits RS, Chiorini JA, Zolotutkhin S, Kozyreva OG, Samulski RJ, Baker

TS, Parrish CR, Agbandje-McKenna M. 2013. Capsid antibodies to different adeno-associated virus serotypes bind common regions. *J Virol* 87:9111-9124. <https://doi.org/10.1128/JVI.00622-13>.

Gurda BL, Parent KN, Bladek H, Sinkovits RS, DiMattia MA, Rence C, Castro A, McKenna R, Olson N, Brown K, Baker TS, Agbandje-McKenna M. 2010. Human bocavirus capsid structure: insights into the structural repertoire of the parvoviridae. *J Virol* 84:5880 -5889. <https://doi.org/10.1128/JVI.02719-09>.

Hafenstein S, Bowman VD, Sun T, Nelson CD, Palermo LM, Chipman PR, Battisti AJ, Parrish CR, Rossmann MG. 2009. Structural comparison of different antibodies interacting with parvovirus capsids. *J Virol* 83: 5556 -5566. <https://doi.org/10.1128/JVI.02532-08>.

Hernando E, Llamas-Saiz AL, Foces-Foces C, McKenna R, Portman I, Agbandje-McKenna M, Almendral JM. 2000. Biochemical and physical characterization of parvovirus minute virus of mice virus-like particles. *Virology* 267:299 -309. <https://doi.org/10.1006/viro.1999.0123>.

Hurtado A, Rueda P, Nowicky J, Sarraseca J, Casal JI. 1996. Identification of domains in canine parvovirus VP2 essential for the assembly of virus-like particles. *J Virol* 70:5422-5429.

Kaufmann B, Lopez-Bueno A, Mateu MG, Chipman PR, Nelson CD, Parrish CR, Almendral JM, Rossmann MG. 2007. Minute virus of mice, a parvovirus, in complex with the Fab fragment of a neutralizing monoclonal antibody. *J Virol* 81:9851-9858. <https://doi.org/10.1128/JVI.00775-07>.

Kontou M, Govindasamy L, Nam HJ, Bryant N, Llamas-Saiz AL, Foces-Foces C, Hernando E, Rubio MP, McKenna R, Almendral JM, Agbandje-McKenna M. 2005. Structural determinants of tissue tropism and in vivo pathogenicity for the parvovirus minute virus of mice. *J Virol* 79: 10931-10943. <https://doi.org/10.1128/JVI.79.17.10931-10943.2005>.

Lang SI, Giese NA, Rommelaere J, Dinsart C, Cornelis JJ. 2006. Humoral immune responses against minute virus of mice vectors. *J Gene Med* 8:1141-1150. <https://doi.org/10.1002/jgm.940>.

Langeveld JP, Casal JI, Vela C, Dalsgaard K, Smale SH, Puijk WC, Melen RH. 1993. B-cell epitopes of canine parvovirus: distribution on the primary structure and exposure on the viral surface. *J Virol* 67:765-772.

Lisowski L, Dane AP, Chu K, Zhang Y, Cunningham SC, Wilson EM, Nygaard S, Grompe M, Alexander IE, Kay MA. 2014. Selection and evaluation of clinically relevant AAV variants in a xenograft liver model. *Nature* 506:382-386. <https://doi.org/10.1038/nature12875>.

Lombardo E, Ramirez JC, Agbandje-McKenna M, Almendral JM. 2000. A beta-stranded motif drives capsid protein oligomers of the parvovirus minute virus of mice into the nucleus for viral assembly. *J Virol* 74: 3804 -3814. <https://doi.org/10.1128/JVI.74.8.3804-3814.2000>.

Lombardo E, Ramirez JC, Garcia J, Almendral JM. 2002. Complementary roles of multiple nuclear targeting signals in the capsid proteins of the parvovirus minute virus of mice during assembly and onset of infection. *J Virol* 76:7049 -7059. <https://doi.org/10.1128/JVI.76.14.7049-7059.2002>.

Lopez-Bueno A, Mateu MG, Almendral JM. 2003. High mutant frequency in populations of a DNA virus allows evasion from antibody therapy in an immunodeficient host. *J Virol* 77:2701-2708. <https://doi.org/10.1128/JVI.77.4.2701-2708.2003>.

Lopez-Bueno A, Rubio MP, Bryant N, McKenna R, Agbandje-McKenna M, Almendral JM. 2006. Host-selected amino acid changes at the sialic acid binding pocket of the parvovirus capsid modulate cell binding affinity and determine virulence. *J Virol* 80:1563-1573. <https://doi.org/10.1128/JVI.80.3.1563-1573.2006>.

Lopez-Bueno A, Segovia JC, Bueren JA, O'Sullivan MG, Wang F, Tattersall P, Almendral JM. 2008. Evolution to pathogenicity of the parvovirus minute virus of mice in immunodeficient mice involves genetic heterogeneity at the capsid domain that determines tropism. *J Virol* 82: 1195-1203. <https://doi.org/10.1128/JVI.01692-07>.

Lopez-Bueno A, Valle N, Gallego JM, Perez J, Almendral JM. 2004. Enhanced cytoplasmic sequestration of the nuclear export receptor CRM1 by NS2 mutations developed in the host regulates parvovirus fitness. *J Virol* 78:10674 -10684. <https://doi.org/10.1128/JVI.78.19.10674-10684.2004>.

Louis Jeune V, Joergensen JA, Hajjar RJ, Weber T. 2013. Pre-existing anti-adenovirus-associated virus antibodies as a challenge in AAV gene therapy. *Hum Gene Ther Methods* 24:59 - 67. <https://doi.org/10.1089/hgtb.2012.243>.

Maroto B, Ramirez JC, Almendral JM. 2000. Phosphorylation status of the parvovirus minute virus of mice particle: mapping and biological relevance of the major phosphorylation sites. *J Virol* 74:10892-10902. <https://doi.org/10.1128/JVI.74.23.10892-10902.2000>.

Merchinsky MJ, Tattersall PJ, Leary JJ, Cotmore SF, Gardiner EM, Ward DC. 1983. Construction of an infectious molecular clone of the autonomous parvovirus minute virus of mice. *J Virol* 47:227-232.

Miest TS, Cattaneo R. 2014. New viruses for cancer therapy: meeting clinical needs. *Nat Rev Microbiol* 12:23-34. <https://doi.org/10.1038/nrmicro3140>.

Mousset S, Rommelaere J. 1982. Minute virus of mice inhibits cell transformation by simian virus 40. *Nature* 300:537-539. <https://doi.org/10.1038/300537a0>.

Muller OJ, Kaul F, Weitzman MD, Pasqualini R, Arap W, Kleinschmidt JA, Trepel M. 2003. Random peptide libraries displayed on adenovirus to select for targeted gene therapy vectors. *Nat Biotechnol* 21: 1040 -1046. <https://doi.org/10.1038/nbt856>.

Paglino JC, Ozduman K, van den Pol AN. 2012. LuIII parvovirus selectively and efficiently targets replicates in, and kills human glioma cells. *J Virol* 86:7280 -7291. <https://doi.org/10.1128/JVI.00227-12>.

Pan Q, Chantry Y, Liang WC, Stawicki S, Mak J, Rathore N, Tong RK, Kowalski J, Yee SF, Pacheco G, Ross S, Cheng Z, Le Couter J, Plowman G, Peale F, Koch AW, Wu Y, Bagri A, Tessier-Lavigne M, Watts RJ. 2007. Blocking neuropilin-1 function has an additive effect with anti-VEGF to inhibit tumor growth. *Cancer Cell* 11:53- 67. <https://doi.org/10.1016/j.ccr.2006.10.018>.

Paulk NK, Pekrun K, Zhu E, Nygaard S, Li B, Xu J, Chu K, Leborgne C, Dane AP, Haft A, Zhang Y, Zhang F, Morton C, Valentine MB, Davidoff AM, Nathwani AC, Mingozzi F, Grompe M, Alexander IE, Lisowski L, Kay MA. 2018. Bioengineered AAV capsids with combined high human liver transduction in vivo and unique humoral seroreactivity. *Mol Ther* 26: 289 -303. <https://doi.org/10.1016/j.ymthe.2017.09.021>.

Pillet S, Annan Z, Fichelson S, Morinet F. 2003. Identification of a nonconventional motif necessary for the nuclear import of the human parvovirus B19 major capsid protein (VP2). *Virology* 306:25-32. [https://doi.org/10.1016/S0042-6822\(02\)00047-8](https://doi.org/10.1016/S0042-6822(02)00047-8).

Plate KH, Breier G, Weich HA, Risau W. 1992. Vascular endothelial growth factor is a potential tumour angiogenesis factor in human gliomas in vivo. *Nature* 359:845- 848. <https://doi.org/10.1038/359845a0>.

Ramirez JC, Santaren JF, Almendral JM. 1995. Transcriptional inhibition of the parvovirus minute virus of mice by constitutive expression of an antisense RNA targeted against the NS-1 transactivator protein. *Virology* 206:57- 68. [https://doi.org/10.1016/S0042-6822\(95\)80019-0](https://doi.org/10.1016/S0042-6822(95)80019-0).

Riolobos L, Reguera J, Mateu MG, Almendral JM. 2006. Nuclear transport of trimeric assembly intermediates exerts a morphogenetic control on the icosahedral parvovirus capsid. *J Mol Biol* 357:1026 -1038. <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2006.01.019>.

Riolobos L, Valle N, Hernando E, Maroto B, Kann M, Almendral JM. 2010. Viral oncolysis that targets Raf-1 signaling control of nuclear transport. *J Virol* 84:2090 -2099. <https://doi.org/10.1128/JVI.01550-09>.

Robinson CJ, Stringer SE. 2001. The splice variants of vascular endothelial growth factor (VEGF) and their receptors. *J Cell Sci* 114:853- 865.

Rodríguez D, González-Aseguinolaza G, Rodríguez JR, Vijayan A, Gherardi M, Rueda P, Casal JJ, Esteban M. 2012. Vaccine efficacy against malaria by the combination of porcine parvovirus-like particles and vaccinia virus vectors expressing CS of Plasmodium. *PLoS One* 7:e34445. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0034445>.

Rommelaere J, Geletneky K, Angelova AL, Daeffler L, Dinsart C, Kiprianova I, Schlehofer JR, Raykov Z. 2010. Oncolytic parvoviruses as cancer therapeutics. *Cytokine Growth Factor Rev* 21:185-195. <https://doi.org/10.1016/j.cytogfr.2010.02.011>.

Ros C, Bayat N, Wolfisberg R, Almendral JM. 2017. Protoparvovirus cell entry. *Viruses* 9:313. <https://doi.org/10.3390/v9110313>.

Rubio MP, Guerra S, Almendral JM. 2001. Genome replication and post-encapsidation functions mapping to the non-structural gene restrict the host range of a murine parvovirus in human cells. *J Virol* 75:11573-11582. <https://doi.org/10.1128/JVI.75.23.11573-11582.2001>.

Rubio MP, Lopez-Bueno A, Almendral JM. 2005. Virulent variants emerging in mice infected with the apathogenic prototype strain of the parvovirus minute virus of mice exhibit a capsid with low avidity for a primary receptor. *J Virol* 79:11280 -11290. <https://doi.org/10.1128/JVI.79.17.11280-11290.2005>.

Rueda P, Hurtado A, del Barrio M, Martínez-Torrecedrada JL, Kamstrup S, Leclerc C, Casal JJ. 1999. Minor displacements in the insertion site provoke major differences in the induction of antibody responses by chimeric parvovirus-like particles. *Virology* 263:89 -99. <https://doi.org/10.1006/viro.1999.9911>.

Rybniak J, Nowag A, Janicki H, Demant K, Hartmann P, Büning H. 2012. Incorporation of antigens into viral capsids augments immunogenicity of adeno-associated virus vector-based vaccines. *J Virol* 86: 13800 -13804. <https://doi.org/10.1128/JVI.01708-12>.

Sánchez-Martínez C, Grueso E, Carroll M, Rommelaere J, Almendral JM. 2012. Essential role of the unordered VP2 N-terminal domain of the parvovirus MVM capsid in nuclear assembly and endosomal enlargement of the virion fivefold channel for cell entry. *Virology* 432:45-56. <https://doi.org/10.1016/j.virol.2012.05.025>.

Sandler A, Gray R, Perry MC, Brahmer J, Schiller JH, Dowlati A, Lilenbaum R, Johnson DH. 2006. Paclitaxel-carboplatin alone or with bevacizumab for non-small-cell lung cancer. *N Engl J Med* 355:2542-2550. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa061884>.

Santaren JF, Ramirez JC, Almendral JM. 1993. Protein species of the parvovirus minute virus of mice strain MVMp: involvement of phosphorylated VP-2 subtypes in viral morphogenesis. *J Virol* 67:5126 -5138.

Santiago-Ortiz JL, Schaffer DV. 2016. Adeno-associated virus (AAV) vectors in cancer gene therapy. *J Control Release* 240:287-301. <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2016.01.001>.

Schoenfeld JD, Dranoff G. 2011. Anti-angiogenesis immunotherapy. *Hum Vaccin* 7:976 -981. <https://doi.org/10.4161/hv.7.9.16407>.

Sedlik C, Saron M, Sarraseca J, Casal I, Leclerc C. 1997. Recombinant parvovirus-like particles as an antigen carrier: a novel nonreplicative exogenous antigen to elicit protective antiviral cytotoxic T cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94:7503-7508. <https://doi.org/10.1073/pnas.94.14.7503>.

Segovia JC, Real A, Bueren J, Almendral JM. 1991. In vitro myelosuppressive effects of the parvovirus minute virus of mice (MVMi) on hematopoietic stem and committed progenitor cells. *Blood* 77:980 -988.

Shein HM, Enders JF, Levinthal JD. 1962. Transformation induced by simian virus 40 in human renal cell cultures. II. Cell-virus relationships. *Proc Natl Acad Sci U S A* 48:1350 -1357. <https://doi.org/10.1073/pnas.48.8.1350>.

Shi W, Arnold GS, Bartlett JS. 2001. Insertional mutagenesis of the adeno-associated virus type 2 (AAV2) capsid gene and generation of AAV2 vectors targeted to alternative cell surface receptors. *Hum Gene Ther* 12:1697-1711. <https://doi.org/10.1089/104303401750476212>.

Shih T, Lindley C. 2006. Bevacizumab: an angiogenesis inhibitor for the treatment of solid malignancies. *Clin Ther* 28:1779 -1802. <https://doi.org/10.1016/j.clinthera.2006.11.015>.

Starzec A, Ladam P, Vassy R, Badache S, Bouchemal N, Navaza A, Du Penhoat CH, Perret GY. 2007. Structure-function analysis of the antiangiogenic ATWLPPR peptide inhibiting VEGF (165) binding to neuropilin-1 and molecular dynamics simulations of the ATWLPPR/neuropilin-1 complex. *Peptides* 28:2397-2402. <https://doi.org/10.1016/j.peptides.2007.09.013>.

Starzec A, Vassy R, Martin A, Lecouvey M, Di Benedetto M, Crépin M, Perret GY. 2006. Antiangiogenic and antitumor activities of peptide inhibiting the vascular endothelial growth factor binding to neuropilin-1. *Life Sci* 79:2370 -2381. <https://doi.org/10.1016/j.lfs.2006.08.005>.

Thorne SH, Tam BYY, Kirn DH, Contag CH, Kuo CJ. 2006. Selective intratumoral amplification of an antiangiogenic vector by an oncolytic virus produces enhanced antivascular and anti-tumor efficacy. *Mol Ther* 13:938 -946. <https://doi.org/10.1016/j.ymthe.2005.12.010>.

Toolan HW, Rhode SL, III, Gierthy JF. 1982. Inhibition of 7, 12-dimethylbenz(a)anthracene-induced tumors in Syrian hamster by prior infection with H-1 parvovirus. *Cancer Res* 42:2552-2555.

Tsao J, Chapman MS, Agbandje M, Keller W, Smith K, Wu H, Luo M, Smith TJ, Rossmann MG, Compans RW, Parrish CR. 1991. The three-dimensional structure of canine parvovirus and its functional implications. *Science* 251:1456 -1464. <https://doi.org/10.1126/science.2006420>.

Tse LV, Klinc KA, Madigan VJ, Castellanos Rivera RM, Wells LF, Havlik LP, Smith JK, Agbandje-McKenna M, Asokan A. 2017. Structure-guided evolution of antigenically distinct adeno-associated virus variants for immune evasion. *Proc Natl Acad Sci U S A* 114:E4812-E4821. <https://doi.org/10.1073/pnas.1704766114>.

Tseng YS, Agbandje-McKenna M. 2014. Mapping the AAV capsid host antibody response toward the development of second generation gene delivery vectors. *Front Immunol* 5:9. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2014.00009>.

Tullis GE, Burger LR, Pintel DJ. 1993. The minor capsid protein VP1 of the autonomous parvovirus minute virus of mice is dispensable for encapsidation of progeny single-stranded DNA but is required for infectivity. *J Virol* 67:131-141.

Ventoso I, Berlanga JJ, Almendral JM. 2010. Translation control by protein kinase R restricts minute virus of mice infection: role in parvovirus oncolysis. *J Virol* 84:5043-5051. <https://doi.org/10.1128/JVI.02188-09>.

Vicari D, Foy KC, Liotta EM, Kaumaya PT. 2011. Engineered conformation-dependent VEGF peptide mimics are effective in inhibiting VEGF signaling pathways. *J Biol Chem* 286:13612-13625. <https://doi.org/10.1074/jbc.M110.216812>.

Warrington KH, Jr, Gorbatyuk OS, Harrison JK, Opie SR, Zolotukhin S, Muzyczka N. 2004. Adeno-associated virus type 2 VP2 capsid protein is nonessential and can tolerate large peptide insertions at its N terminus. *J Virol* 78:6595- 6609. <https://doi.org/10.1128/JVI.78.12.6595-6609.2004>.

Watanabe M, Boyer JL, Crystal RG. 2010. AAVrh.10-mediated genetic delivery of bevacizumab to the pleura to provide local anti-VEGF to suppress growth of metastatic lung tumors. *Gene Ther* 17:1042-1051. <https://doi.org/10.1038/gt.2010.87>.

Wentink MQ, Hackeng TM, Tabruyn SP, Puijk WC, Schwamborn K, Altschuh D, Meloen RH, Schuurman T, Griffioen AW, Timmerman P. 2016. Targeted vaccination against the bevacizumab binding site on VEGF using 3D-structured peptides elicits efficient antitumor activity. *Proc Natl Acad Sci U S A* 113:12532-12537. <https://doi.org/10.1073/pnas.1610258113>.

Xie Q, Bu W, Bhatia S, Hare J, Somasundaram T, Azzi A, Chapman MS. 2002. The atomic structure of adeno-associated virus (AAV-2), a vector for human gene therapy. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99:10405-10410. <https://doi.org/10.1073/pnas.162250899>.

Xie Y, Hicks MJ, Kaminsky SM, Moore MA, Crystal RG, Rafii A. 2014. AAV-mediated persistent bevacizumab therapy suppresses tumor growth of ovarian cancer. *Gynecol Oncol* 135:325-332. <https://doi.org/10.1016/j.ygyno.2014.07.105>.

Yang Y, Zhang Y, Cao Z, Ji H, Yang X, Iwamoto H, Wahlberg E, Länne T, Sun B, Cao Y. 2013. Anti-VEGF- and anti-VEGF receptor-induced vascular alteration in mouse healthy tissues. *Proc Natl Acad Sci U S A* 110: 12018 -12023. <https://doi.org/10.1073/pnas.1301331110>.

Yu DC, Lee JS, Yoo JY, Shin H, Deng H, Wei Y, Yun CO. 2012. Soluble vascular endothelial growth factor decoy receptor FP3 exerts potent antiangiogenic effects. *Mol Ther* 20:938 -947. <https://doi.org/10.1038/mt.2011.285>.

Astell, C. R., M. E. Gardiner, and P. Tattersall. 1986. DNA sequence of the lymphotropic variant of minute virus of mice, MVM(i), and comparison with the DNA sequence of the fibrotropic prototype strain. *J. Virol.* 57: 656-669.

Blecker, S., F. Sontag, and J.A. Kleinschmidt. 2005. Mutational analysis of narrow pores at the fivefold symmetry axes of adeno-associated virus type 2 capsids reveals a dual role in genome packaging and activation of phospholipase A2 activity. *J. Virol.* 79:2528-2540.

Cotmore, S. F., A. M. D'Abamo, C. M. Ticknor, and P. Tattersall. 1999. Controlled conformational transitions in the MVM virions expose the VP1 N-terminus and viral genome without particle disassembly. *Virology.* 254: 169-181.

Cotmore, S. F., and P. Tattersall. 2007. Parvoviral host range and cell entry mechanisms. *Adv. Virus. Res.* 70: 183-232.

Cotmore, S.F., and P. Tattersall. 2004. Encapsidation of minute virus of mice DNA: aspects of the translocation mechanism revealed by the structure of partially packaged genomes. *Virology* 336: 100-112.

Farr, G. A., S. F. Cotmore, and P. Tattersall. 2006. VP2 cleavage and the leucine ring at the base of the fivefold cylinder control pH-dependent externalization of both the VP1 N terminus and the genome of minute virus of mice. *J. Virol.* 80:161-171.

Farr, G.A., Zhang, L.G., and Tattersall, P. 2005. Parvoviral virions deploy a capsid-tethered lipolytic enzyme to breach the endosomal membrane during cell entry. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 102: 17148-53.

Kaufmann, B., A. A. Simpson, and M. G. Rossmann. 2004. The structure of human parvovirus B19. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 101:11628–11633.

Kaufmann, B., Chipman, P.R., Kostyuchenko, V.A., Modrow, S., and M.G. Rossmann. 2008. Visualization of the externalized VP2 n termini of infectious human parvovirus B19. *J. Virol.* 82: 7306-7312.

Kestler, J., Neeb, B., Struyf, S., Van Damme, J., Cotmore, S.F., D'Abamo, A., Tattersall, P., Rommelaere, J., Dinsart, C., and J.J. Cornelis. 1999. Cis requirements for the efficient production of recombinant DNA vectors based on autonomous parvoviruses. *Hum. Gene Ther.* 10: 1619-1632.

Langeveld, J.P.M., Casal, I., Osterhaus, A.D.M.E., Cortés, E., de Swart, R., Vela, C., Dalsgaard, K., Puijk, W.C., Schaaper, W.M.M., and R.H. Meleis. 1994. First peptide vaccine providing protection against viral infection in the target animal: studies of canine parvovirus in dogs. *J. Virol.* 68: 4506-4513.

Maroto, B., N. Valle, R. Saffrich, and J. M. Almendral. 2004. Nuclear export of the nonenveloped parvovirus virion is directed by an unordered protein signal exposed on the capsid surface. *J. Virol.* 78:10685-10694.

Maxwell, I.H., Chapman, J.T., Scherrer, L.C., Spitzer, A.L., Leptihn, S., Maxwell, F., and Corsini, J.A. 2001. Expansion of tropism of a feline parvovirus to target a human tumor cell line by display of an alpha (v) integrin binding peptide on the capsid. *Gene Ther.* 8: 324-31.

Olsson, A.K., A. Dimberg, J. Kreuger, and L. Claesson-Welsh. 2006. VEGF receptor signalling - in control of vascular function. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 7: 359-371.

Plate, K.H., Breier, G., Weich, H.A. and Risau, W. 1992. Vascular endothelial growth factor is a potential tumour angiogenesis factor in human gliomas in vivo. *Nature* 359: 845-8.

Ramírez, J. C., A. Fairén, and J. M. Almendral. 1996. Parvovirus Minute Virus of Mice strain i multiplication and pathogenesis in the newborn mouse brain is restricted to proliferative areas and to migratory cerebellar young neurons. *J. Virol.* 70: 8109-8116.

Reguera, J., A. Carreira, L. Riobos, J. M. Almendral, and M. G. Mateu. 2004. Role of interfacial amino acid residues in assembly, stability, and conformation of a spherical virus capsid. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 101: 2724-2729.

Segovia, J. C., J. M. Gallego, J. A. Bueren, and J. M. Almendral. 1999. Severe leukopenia and dysregulated erythropoiesis in SCID mice persistently infected by the parvovirus minute virus of mice. *J. Virol.* 73: 1774-1784.

Tattersall, P., A. J. Shatkin, and D. C. Ward. 1977. Sequence homology between the structural polypeptides of Minute Virus of Mice. *J. Mol. Biol.* 111: 375-394.

Tattersall, P., and J. Bratton. 1983. Reciprocal productive and restrictive virus-cell interaction of immunosuppressive and prototype strains of minute virus of mice. *J. Virol.* 46: 944-955.

Tattersall, P., P. J. Cawte, A. J. Shatkin, and D. C. Ward. 1976. Three structural polypeptides coded for by minute virus of mice, a parvovirus. *J. Virol.* 20: 273-289.

Vandenberghe, L.H., J.M. Wilson, and G. Gao. 2009. Tailoring the AAV vector capsid for gene therapy. *Gene Ther.* 16: 311-319.

Wu, P., Xiao, W., Conlon, T., Hughes, J., Agbandje-McKenna, M., Ferkol, T., Flotte, T. and Muzyczka, N. 2000. Mutational analysis of the adeno-associated virus type 2 (AAV2) capsid gene and construction of AAV2 vectors with altered tropism. *J Virol.* 74: 8635-47.

Yang, Q., Mamounas, M., Yu, G., Kennedy, S., Leaker, B., Merson, J., Wong-Staal, F., Yu, M. and Barber, J.R. 1998. Development of novel cell surface CD34-targeted recombinant adenoassociated virus vectors for gene therapy. *Hum Gene Ther.* 9: 1929-37.

Zadori, Z., Szelei, J., Lacoste, M.-C., Li, Y., Garriepy, S., Raymond, P., Allaire, M., Nabi, I.R., and Tijssen, P. 2001. A viral phospholipase A₂ is required for parvovirus infectivity. *Dev. Cell* 1: 291-302.

FIGURES

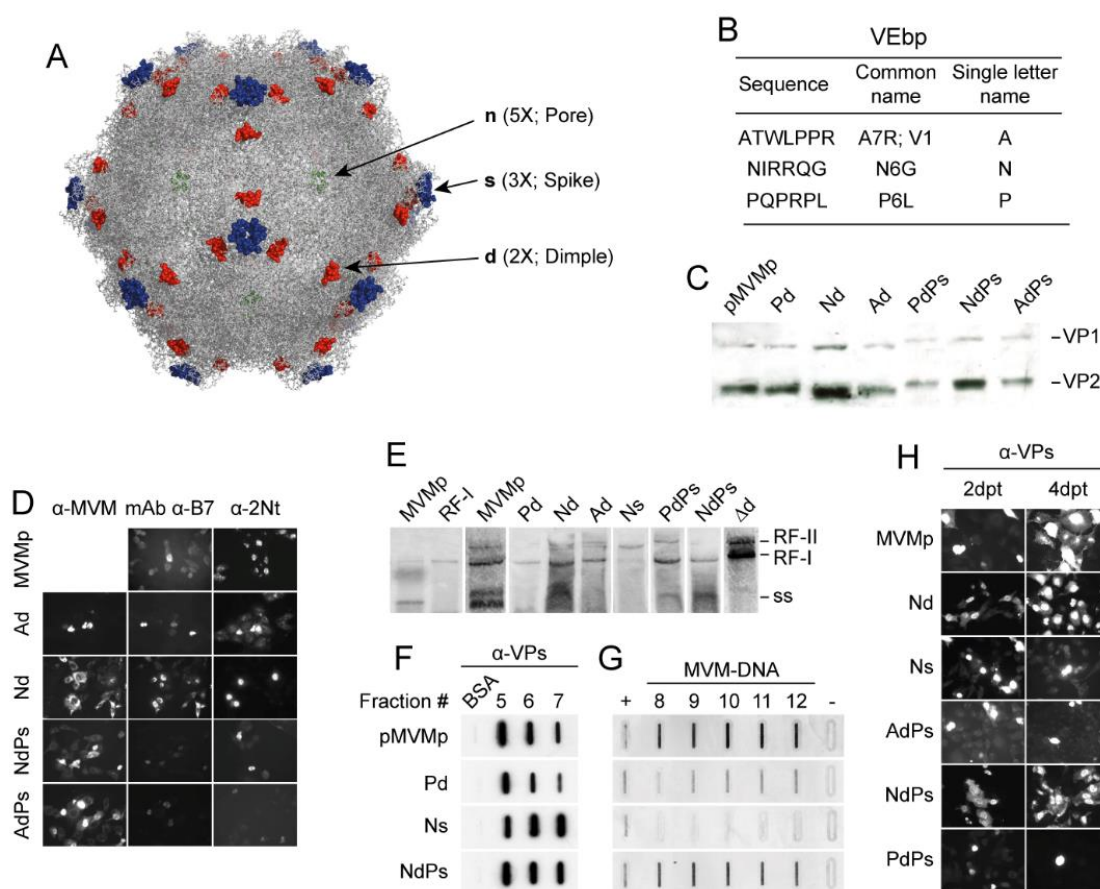


FIG. 1. Phenotypes of MVMP chimeric viruses engineered with VEGF-blocking peptides at three capsid domains. (A) Structure of the MVMP virus capsid (PDB....) highlighting the precise manipulated domains at the dimple (2x), spike (3x), and VP2- N-terminus (5x). (B) Sequence of the VEGF-blocking peptides used in this study. Common names are shown to the right, and single letter code used here in bold. (C) Western-blot analysis of the VPs protein expression accumulated at 4 dpt with the indicated molecular clones. Primary antibody was anti-VPs. (D) IF-staining of the same cultures at 4 dpt with the indicated antibodies. Representative fields are shown. (E) Genomic replication and ssDNA encapsidation capacity of chimeric viruses. Southern-blot analysis performed at 2 dpt with NB324K transfected by the indicated molecular clones. The positions of the single-stranded DNA (ss) virus genome, and that of the monomeric (RF-I) and dimeric (RF-II) replicative forms, are indicated. (F, G) Slot-blot analysis of chimeric virus assembly performed in samples harvested at 2 dpt and fractionated by cesium chloride gradients. (F) VP proteins detected by anti-VPs staining in fractions corresponding to the position of empty capsid sedimentation. (G) Virus DNA detected by hybridization in fractions of the same gradient. (H) Analysis of infectivity of chimeric viruses by progression in culture. NB324K cells were transfected with the indicated molecular genomic clones and cells expressing VPs protein stained by IF at 2 and 4 days post-transfection (dpt).

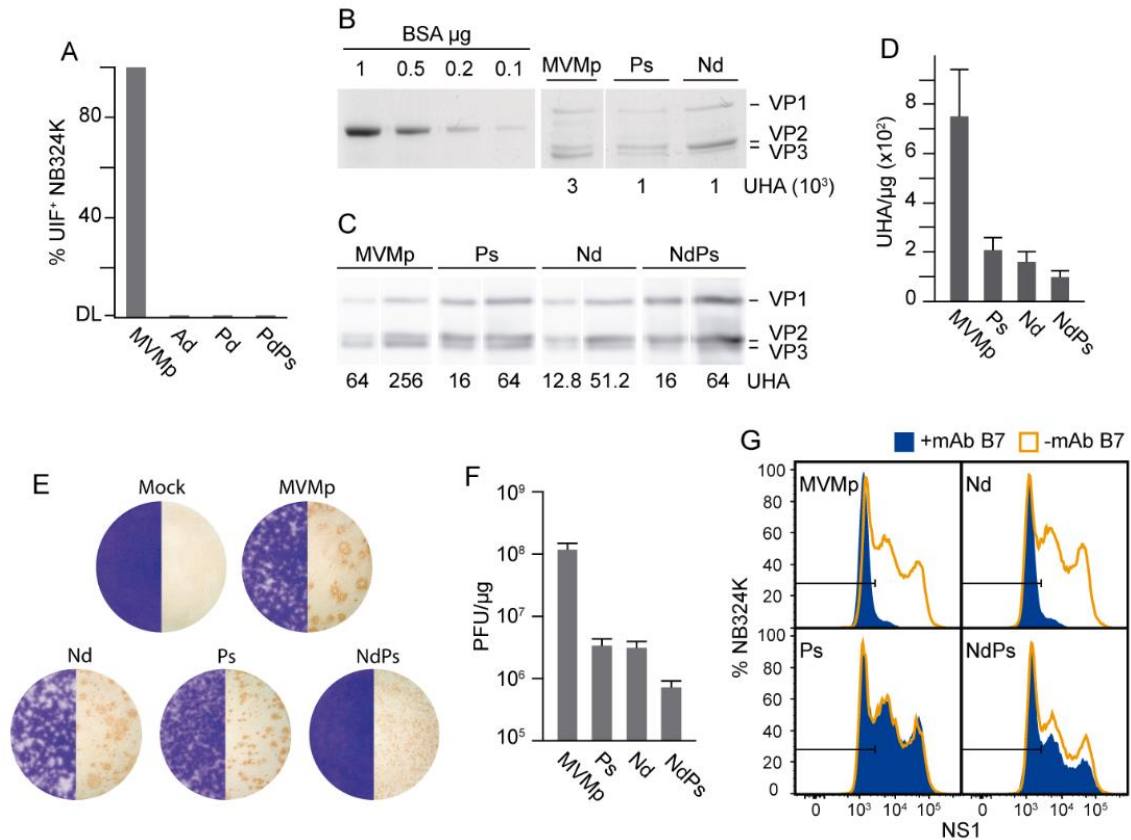


FIG. 2. Specific infectivity of MVM VERb-chimeric virions. (A) Specific infectivity of the outlined purified virions determined by IF staining of VP expressing cells at 24 hpi. (B) Quantitative analysis of the mass of CsCl-gradient purified DNA-filled wt and VERb-MVM chimeric virions by SDS-PAGE coomassie staining. The amount of HAUs loaded for each of the viruses are indicated. BSA was used as mass loading control. (C) Similar analysis performed by western-blot with the anti-VPs antibody (*bottom*). The amount of HAUs loaded for each of the viruses are indicated. (D) Specific HA capacity obtained for the indicated viruses from the analysis outlined in C-E. Values were scored from at least two independent virion preparations. (E) Plaque morphology. The figure illustrates the size and lytic character of the plaques formed in NB324K cells by the indicated wt and chimeric MVMp viruses. *Left half*, crystal violet staining; *right half*, □-VPs antibody staining. (F) Specific infectivity outlined by the ratio of PFUs (developed by □-VPs antibody staining) scored in NB324K monolayers inoculated with measured amounts of purified virus particles. Value are the means with standard errors. (G) Cytometric analysis of NS1 protein expression in cultured inoculated with normalized amounts of infectious viruses either in PBS (-B7) or upon incubation with the B7-Mab neutralizing antibody (+B7). Cell extracts harvested at 20 hpi were analyzed by flow cytometry with the anti-NS1 rabbit antibody.

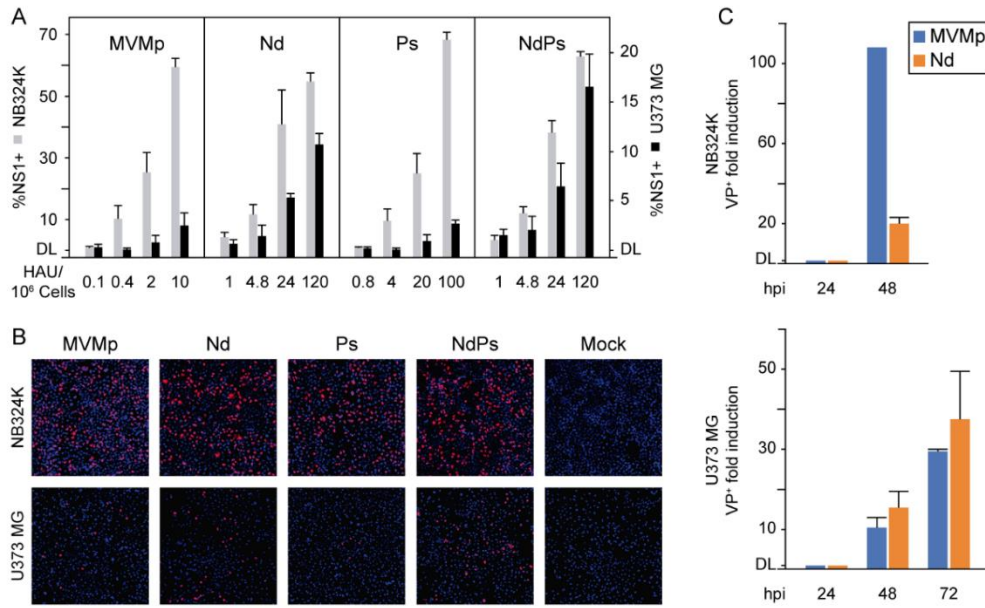


FIG. 3. Peptide N inserted in the dimple enhances MVM tropism for human glioblastoma cells. (A) Relative infectivity of wtMVMp and chimeric Nd, Ps and NdPs virions in NB324K (gray bars) and U373MG (black bars) human cells. The monolayers were inoculated with the indicated graded amounts of purified virions quantitated as hemagglutination units (HAU) per 10⁶ cells. Outlined data are the percentage of NS1+ expressing cells determined by IF-confocal and scored as the mean with standard errors from at least three fields (n[^]10³). (B) Example of IF-staining showing a relative higher proportion of NS1+ in U373MG vs NB324K cells upon inoculations with the Nd and NdPs virions. (C) Progression of wt and Nd viral infection in cultures inoculated at low multiplicity.

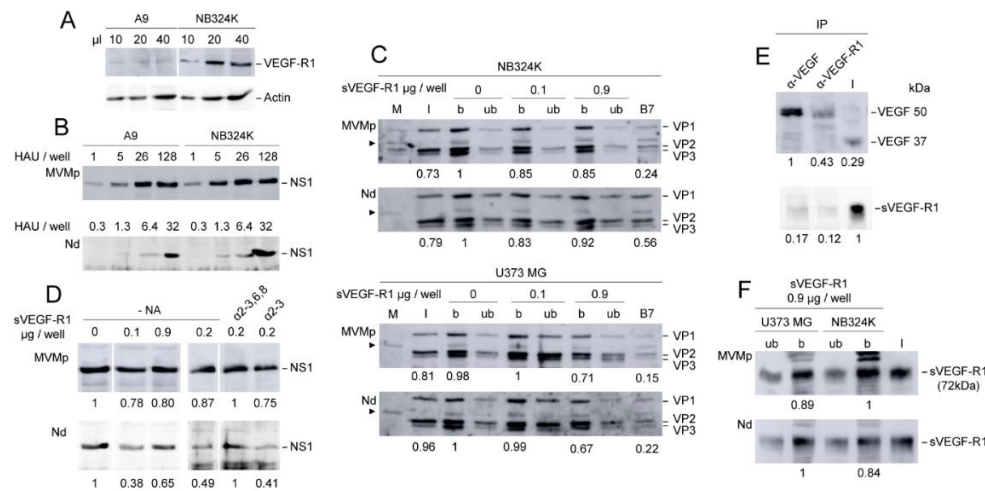


FIG. 4. Analysis of the use of VEGF-R1 for binding and infection by chimeric virions. (A) Differential expression of VEGF-R1 in cell lines detected by western-blot. (B) NB324K/A9 relative infection capacity of wtMVMp and the Nd chimera analyzed by NS1 expression in western-blot. (C) Binding analysis of MVMp, Nd and Ps chimeric virions to NB324K and U373MG cells in the absence or presence of the indicated amounts of sVEGF-R1. Detection by western-blotting of the viral structural proteins (VP1, VP2, VP3) are shown in the bound (b) and unbound (ub) samples. * VP-like protein present in uninfected cells of uncertain origin. (D) Western-blotting detection of VEGF-R1 in the b and ub samples from the binding assay shown in (C) performed at the high dose (4.15µg) of sVEGF-R1. (E) Analysis of VEGF/sVEGF-R1 binding. The factor and soluble receptor were incubated at a concentration of 5 ng/ml followed by IP- sepharose and western-blotting with specific antibodies. (F) NS1 expression upon a binding assay performed as in (A), with wt and chimeric virions inoculated onto NB324K cell monolayers in the presence of graded amounts of sVEGF-R1. Shown are western-blotting performed at 20 hpi. (G) NS1 protein expression at 20 hpi in NB324K cells inoculated at 4 °C with MVMp and Nd virions in the presence of sVEGF-R1 previously incubated with α-2-3 and α-2-3,6,8 sia-cleaving neuraminidases. Numbers below the panels are relative arbitrary units (a.u.) of densitometry.

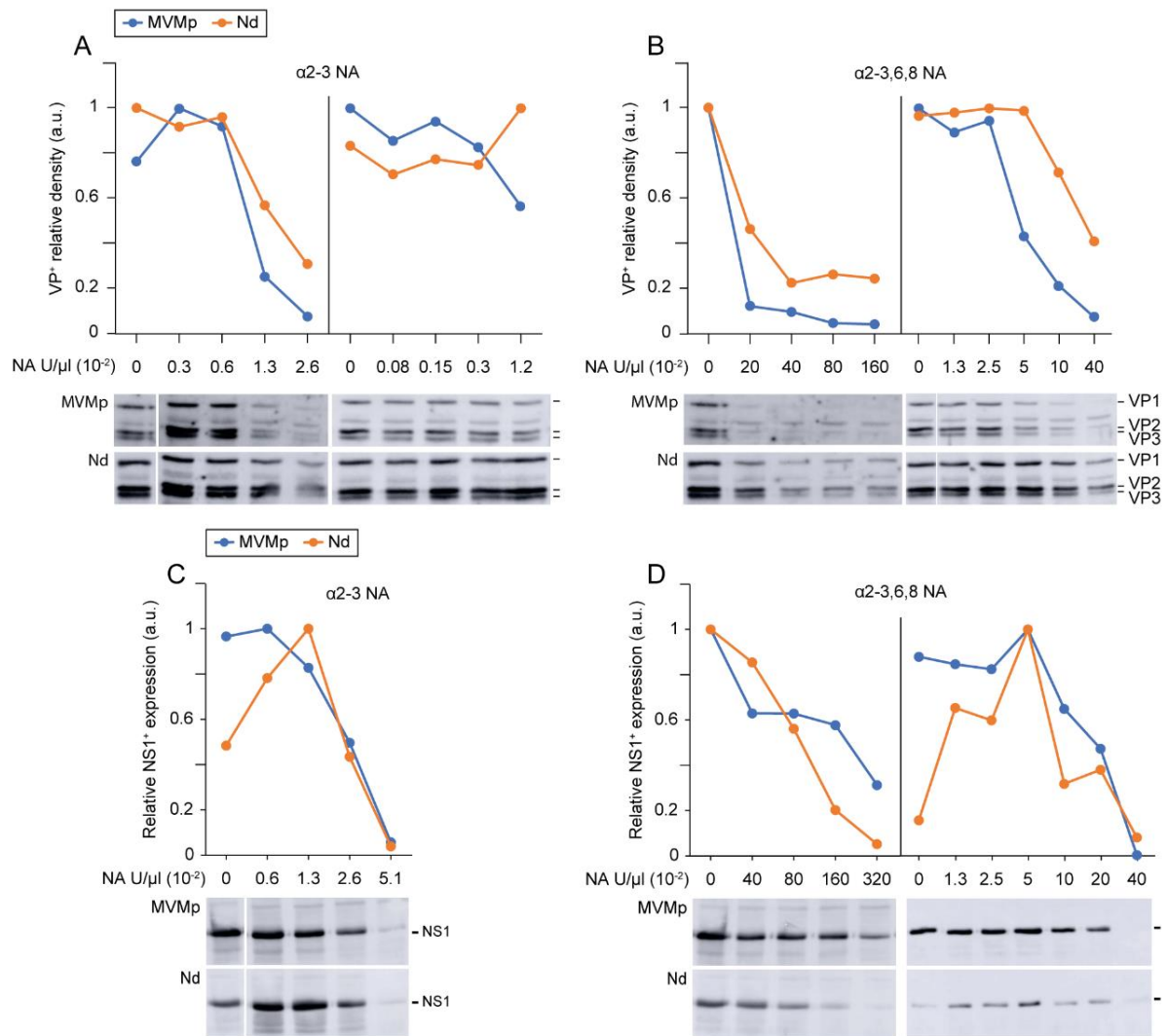


FIG. 5. Role of sialic acid binding in the wt and Nd infection of NB324K human transformed fibroblasts. *Upper part of the figure:* binding assays of the MVMp and the chimeric Nd viruses to NB324K fibroblasts in the presence of (A) α -2-3 and (B) α -2-3,6,8 sia-cleaving neuraminidases performed at high (left graphs) and low (right graphs) neuraminidase doses. Bound viral structural proteins (VP1, VP2, VP3) were detected and quantitated by western-blotting. (*) VP-like protein of uncertain origin. Representative results from at least two independent experiments yielding similar outcome are shown. a.u. relative arbitrary units of densitometry. *Lower part of the figure:* analysis performed in parallel on the capacity of the wt and chimeric Nd virions to infect NB324K cells in the presence of the indicated concentrations of the (C) α -2-3- and (D) α -2-3,6,8-sia cleaving neuraminidases. Cells were inoculated with equivalent amounts of MVMp (blue) and Nd (orange) purified virions, and productive infection was quantitated by the level of the viral NS1 protein expression measured in western-blot performed at 20 hpi. The relative density of each band has been illustrated in the respective graphs. One representative experiment from at least two independent assays performed per condition has been illustrated.

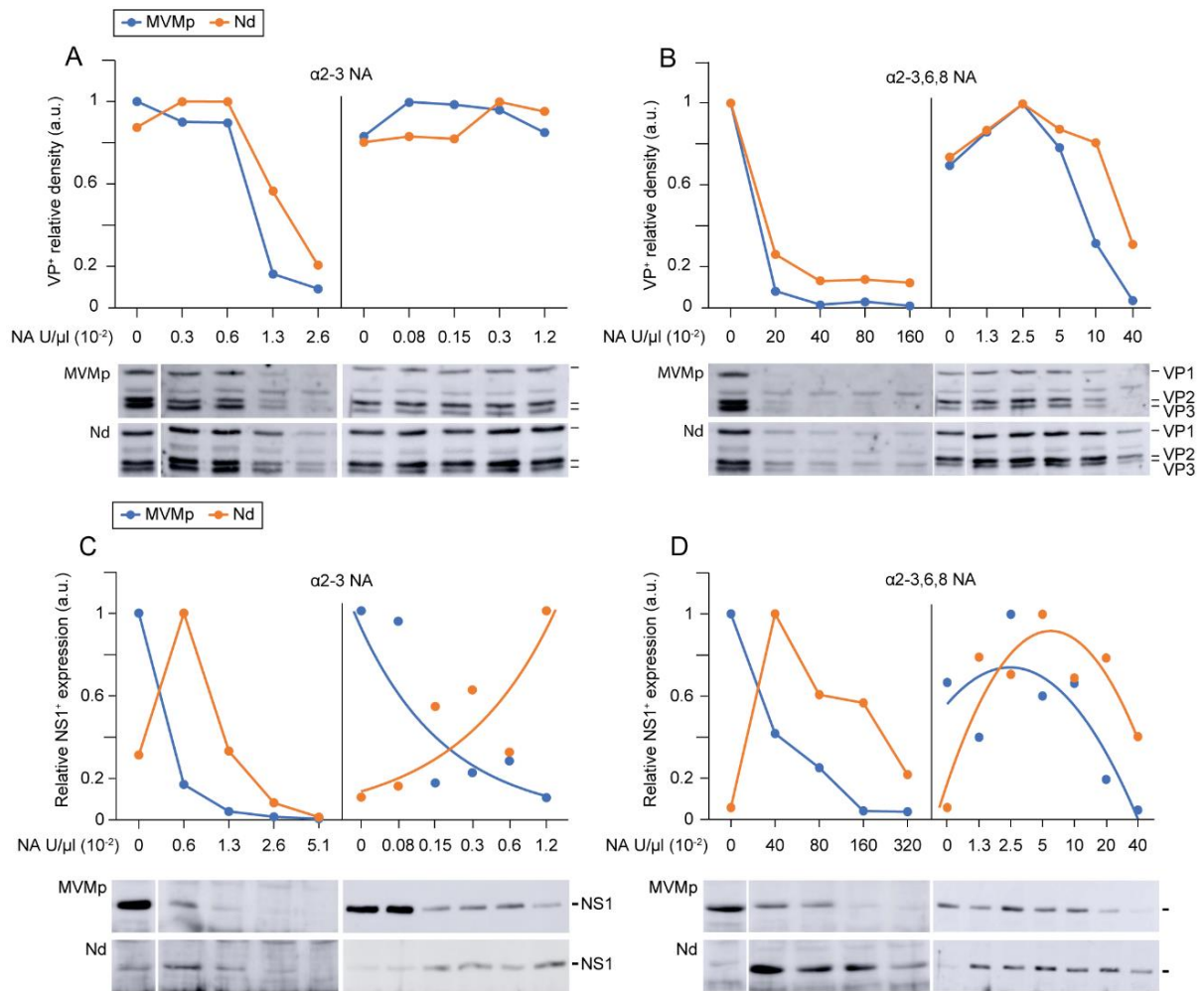


FIG. 6. Role of sialic acid binding in the wt and Nd infection of U373MG human glioblastoma cells. The figure illustrates similar analysis as described in FIG.5 on the capacity of the wt and Nd virions to bind (A, B) and infect (C, D) U373MG glioblastoma cells in the presence of the indicated amounts of α -2-3- and α -2-3,6,8-sialic acid cleaving neuraminidases. One representative experiment from at least two independent assays performed per condition has been illustrated.

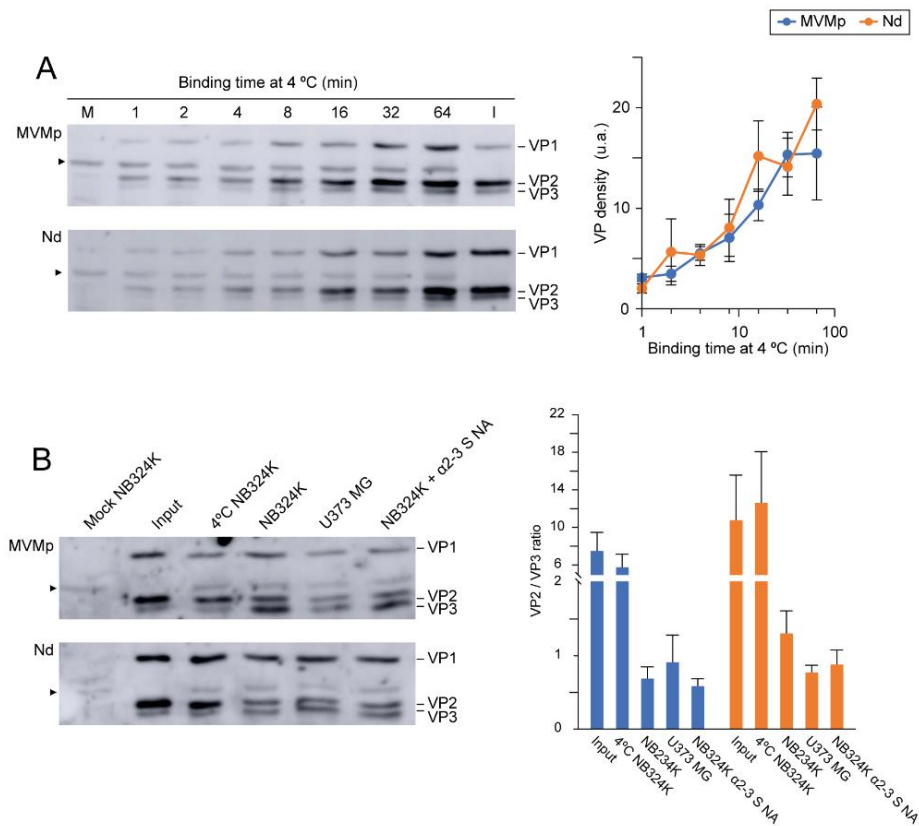


FIG. 7. Affinity of sialin binding in the infectious entry of the wt and Nd virions. Data are the percentage of the mean \pm standard error of bound capsids expressed as a.u. of densitometry from three independent experiments.

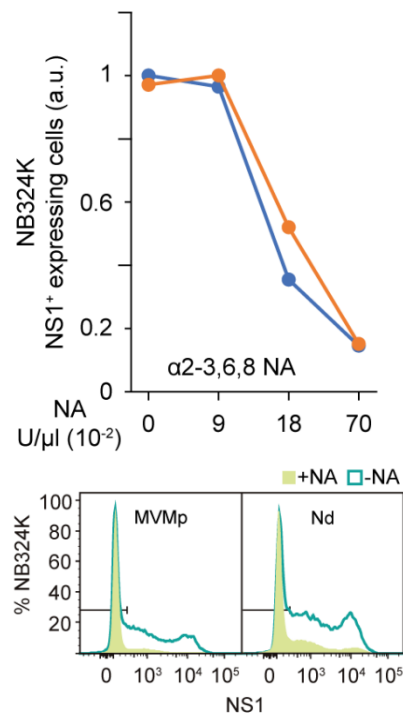


FIG. S5. Cytometric analysis of NS1 expression in NB324K cells treated with the indicated dosis of α -2,3,6,8-sialinase. *Upper*, relative NS1 expression values at the indicated dosis of NA in extracts collected at 20 hpi are shown; *Lower*, example of the cytometric results obtained for both viruses with samples treated with the 18 units dosis.

Table I.

Table 1. Phenotype of VEbp-MVMp chimeric virions

	Mono-Domain									Bi-Domain							
	Wt	Δd	Ad	Nd	Pd	As ⁽²⁾	Ns	Ps ⁽²⁾	An ⁽¹⁾	Ad Ps	Nd Ps	Pd As	Pd Ns	Pd Ps	An Ad	An Nd	An Pd
^a Capsid epitopes	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
^b 3X epitope	+	-	+	+	+	-	-	-	+	-	-	-	-	-	+	+	+
^c Capsid Protein yield	+	-	nd	+	+	+/-	+	+	+	nd	+	nd	nd	nd	nd	+	nd
^d Genome replication	+	+	+	+	+	+	+	+	nd	nd	+	+	nd	+	nd	nd	nd
^e Full virus yield	+	-	+	+	+	+/-	-	+	+	nd	+	-	-	+	+	+	+
^f Progression in culture	+	-	-	+	-	+/-	-	+	-	-	+	-	-	-	-	-	-

^a α-MVM polyclonal antibody staining by IF assay in transfected cells.

^b IF staining with mAb-B7 antibody at 2dpt.

^c Detection of capsid proteins in CICs gradients by slot blot.

^d Detection of the RF-I replicative intermediate by southern blot.

^e Demonstration of ssDNA packaged virions by α-2Nt IF-staining, and/or hybridization in southern or slot blot.

^f Increased VP⁺ expression cells along 2-4dpt interval.

(¹) From Sánchez-Martínez et al. 2012. (²) From Gueso et al. 2019.

■ Full infectious. ■ Non infectious virions. nd, not determined