



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO**

---

**POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS**

**FACULTAD DE CIENCIAS**

**TERAPIA GÉNICA EN CÁNCER DE VEJIGA**

**T E S I S**

**QUE PARA OBTENER EL GRADO DE:**

**DOCTOR EN CIENCIAS (BIOLOGÍA)**

**PRESENTA:**

**JOSÉ GUSTAVO CABRERA AQUINO**

**DIRECTOR DE TESIS: DR. DAVID T. CURIEL**

**MÉXICO D.F.**

**AGOSTO 2008**

## AGRADECIMIENTOS

La presente tesis fue posible gracias al apoyo, a la amistad y al cariño de muchas personas:

**Agradezco a mis padres**, quienes han sido y siempre serán un ejemplo de cariño, rectitud, valores y de vidas dedicadas a la docencia, a la investigación y al fortalecimiento de las instituciones académicas de nuestro país.-

**A mi esposa e hijos**, de quienes he recibido apoyo y cariño incondicional en tiempos difíciles.-

Agradezco al **Dr. David Curiel** por haberme dado la oportunidad y abrirme las puertas del *Centro de Terapia Génica* de la Universidad de Alabama en Birmingham.-

**Corey K. Goldman**. Thank you so very much for the support and for taking me by the hand through the “*School of Hard Knocks*”; you know what I mean. You will always be my bud.-

**Alain Piche y Claudine Rancourt**. Thank you so much for the support during hard times.-

**Jessy Deshane, Jon Grimm, Maryland Rosenfeld, Sharon y Scott Michael**. Thanks guys for your friendship and support during my stay at UAB’s Gene Therapy Program.-

**Stacy Porvasnik**. Thank you so much for teaching me all I know about microsurgery.-  
A la familia **Solana**, por su cariño y apoyo durante tiempos difíciles.-

**Blanca Segura**, por su apoyo y empuje incondicionales en la fase final de la obtención de este grado. La presente tesis no se habría materializado sin su apoyo, insistencia y paciencia.-

**Dr. Alejandro García-Carrancá**, por su apoyo desde el inicio de mi carrera científica.-

Al coach **William Michaels**; quien me enseñó que “*A quitter never wins, and a winner never quits*”.

A la **Facultad de Ciencias** de la UNAM por su apoyo durante mi estancia en el *Centro de Terapia Génica* de la Universidad de Alabama em Birmingham .-

## ÍNDICE GENERAL

RESUMEN.....	1
SUMMARY.....	2
CÁNCER Y ANGIOGÉNESIS.....	3
LA FAMILIA DE FACTORES DE CRECIMIENTO DEL ENDOTELIO VASCULAR.....	7
INMUNOGLOBULINAS Y SU USO EN LA TERAPÉUTICA MÉDICA.....	17
LA TRANSGÉNESIS TERAPÉUTICA DEL CÁNCER.....	21
EL ADENOVIRUS COMO VECTOR EN LA TERAPIA GÉNICA.....	26
JUSTIFICACIÓN.....	34
OBJETIVO GENERAL.....	35
OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	35
HIPÓTESIS.....	36
MATERIALES Y MÉTODOS.....	37
RESULTADOS.....	49
DISCUSIÓN.....	71
CONCLUSIONES.....	79
BIBLIOGRAFÍA.....	80

## ÍNDICE DE FIGURAS, TABLAS Y ESQUEMAS

Figura 1. Balanza Angiogénica.....	5
Figura 2. Eventos principales de la angiogénesis tumoral.....	6
Figura 3. Estructura genómica e isoformas del gen codificante de VEGF-A.....	9
Figura 4. Estructura de los factores de crecimiento del endotelio vascular (VEGF).....	12
Figura 5. Familia de receptores para los factores de crecimiento del endotelio vascular.....	14
Figura 6. Estructura de los receptores para VEGF.....	15
Figura 7. Estructura general de las inmunoglobulinas.....	18
Figura 8. Organización estructural y genómica de la región variable de las inmunoglobulinas.....	19
Figura 9. La transgénesis terapéutica del cáncer.....	22
Figura 10. Estrategias anti-angiogénicas mediante transgénesis.....	24
Figura 11. Estructura adenoviral.....	28
Figura 12. La cápside adenoviral y los receptores involucrados en el proceso de infección.....	29
Figura 13. El proceso de infección adenoviral.....	30
Figura 14. Cinética de la infección adenoviral.....	31
Figura 15. Evolución de los vectores adenovirales para su uso en la transgénesis terapéutica.....	33

Figura 16. Caracterización de un anticuerpo intracelular de cadena sencilla dirigido al factor de crecimiento del endotelio vascular humano isoforma 165 (Hu-VEGF-165).....	50
Figura 17. Estructura molecular y peptídica del scFv inhibidor de la secreción de Hu-VEGF-165.....	51
Figura 18. Expresión del scFv en la línea de cáncer de vejiga humana T-24.....	52
Figura 19. El scFv inhibe la secreción de VEGF-165 humano en un panel de células neoplásicas.....	53
Figura 20. Generación de un adenovirus recombinante codificante para el Hu-VEGF-165.scFv (I).....	54
Figura 21. Generación de un adenovirus recombinante codificante para el Hu-VEGF-165.scFv (II).....	54
Figura 22. Generación de un adenovirus recombinante codificante para el Hu-VEGF-165.scFv (III).....	55
Figura 23. Adenovirus recombinantes transducen eficientemente líneas celulares de urotelio humano.....	57
Figura 24. Patrón temporal de expresión génica en la línea celular de cáncer de vejiga humana T-24.....	58
Figura 25. Adenovirus recombinantes transducen eficientemente tejido genito-urinario humano primario no neoplásico.....	59
Figura 26. Adenovirus recombinantes transducen eficientemente la línea celular de cáncer de vejiga de ratón MBT-2.....	60

Figura 27. Patrón temporal de expresión génica en la línea de cáncer de vejiga de ratón MBT-2.....	61
Figura 28. Adenovirus recombinantes transducen eficientemente urotelio murino <i>in vivo</i> .....	62
Figura 29. Anatomía y propiedades del músculo cremaster de la rata.....	63
Figura 30. Cinética de crecimiento tumoral en el músculo cremaster de la rata desnuda.....	65
Figura 31. Desarrollo de angiogénesis en los tumores crecidos en el músculo cremaster de la rata desnuda.....	65
Figura 32. Transducción adenoviral tumoral por vía intra-arterial.....	66
Figura 33. Transducción muscular por vía intra-arterial.....	67
Figura 34. Curva dosimétrica adenoviral.....	68
Figura 35. Efecto del tiempo de incubación sobre la transducción tumoral mediada por adenovirus recombinantes.....	70
Tabla 1. Propiedades de los vectores en la terapia génica.....	26
Esquema I. Ensamblaje de un scFv dirigido a Hu-VEGF-165.....	37
Esquema II. Ensayo de levantado de colonias.....	38
Esquema III. Selección, expansión y ensayos funcionales de clonas positivas.....	39

## RESUMEN-

Las nuevas estrategias para el tratamiento del cáncer incluyen el uso de anticuerpos monoclonales, inhibidores de tirosina cinasas, fármacos epigenéticos y transgénesis terapéutica. Las estrategias de transgénesis propuestas para el tratamiento del cáncer comprenden la inhibición de oncogenes, la reconstitución de genes supresores, la inmunopotencialización genética, el uso de genes codificantes para enzimas activadoras de prodrogas y diversas estrategias para suprimir la angiogénesis tumoral. El objetivo de la presente tesis fue ensamblar y caracterizar un anticuerpo de cadena sencilla (scFv) que al ser expresado intracelularmente interacciona con el factor de crecimiento del endotelio vascular humano isoforma 165 (Hu-VEGF-165) e inhibe su secreción. Se realizaron estudios de transducibilidad adenoviral en células de cáncer de vejiga *in vitro* y se estudiaron los perfiles de transducibilidad adenoviral al urotelio *in vivo*. Adicionalmente, se caracterizó un nuevo modelo de transgénesis terapéutica que permite la transducción tumoral vía intra-arterial, así como el control del tiempo de interacción virus-célula; con lo cual se optimizan los perfiles de transducción tumoral. Los resultados obtenidos durante el desarrollo de la presente tesis podrían ser de utilidad para el tratamiento de cáncer de vejiga y de diversos tumores sólidos.

## SUMMARY-

Novel cancer treatment strategies include monoclonal antibodies, tyrosine kinase inhibitors, epigenetic modulating compounds and gene therapy strategies. Gene therapy strategies such as tumor suppressor gene replacement, dominant oncogene ablation, the use of suicide genes, gene mediated immunopotential and tumor angiogenesis inhibition, have been proposed to complement conventional cancer treatment schemes. The objective of the present thesis was to develop a single chain antibody (scFv) that when expressed intracellularly, interacts with the human vascular endothelial growth factor isoform 165 (Hu-VEGF-165) blocking its secretion. During the development of the present thesis adenoviral transduction profiles were defined in various bladder cancer cell lines *in vitro* and in normal urothelium *in vivo*. Additionally, a novel intra arterial delivery model was characterized in order to optimize adenoviral mediated tumor transduction. The results obtained during the development of the present thesis could be of use to complement the conventional schemes for the treatment of bladder cancer and other solid tumors.

## CÁNCER Y ANGIOGÉNESIS

El cáncer se define como un grupo de patologías que evolucionan en etapas clínicas y moleculares definidas y que tienen como común denominador la división celular descontrolada y la invasión de tejido contiguo y a distancia [1-6]. El cáncer inicia con la ganancia en la función de oncogenes, progresa con la pérdida de la función de genes supresores de tumores y es seguido por el desarrollo de vasos sanguíneos junto con la modulación de la respuesta inmunológica para evadir su reconocimiento. Finalmente, las células que comprenden la masa tumoral invaden el tejido contiguo, se desprenden de la masa tumoral primaria y colonizan órganos a distancia por vía hematogena y linfática. Paulatinamente las células colonizadoras afectan la función de dichos órganos hasta que el daño generado no es compatible con la vida [7-11].

En la década de los 70s, inicialmente el Dr. Judah Folkman y posteriormente diversos grupos, establecieron que el crecimiento de masas tumorales depende de la generación de nuevos vasos sanguíneos, proceso que se denominó “angiogénesis tumoral” [12-15]. La evidencia que condujo a la determinación que el crecimiento tumoral es angiodependiente era: 1) el crecimiento de tumores implantados subcutáneamente era lineal antes del inicio del proceso de vascularización y exponencial posterior a la vascularización. Este fenómeno había sido demostrado en varios modelos animales. 2) Se había documentado una relación directa entre el índice mitótico de las células tumorales y la distancia al capilar más cercano. Entre menor distancia mayor actividad mitótica y 3) posterior a la inyección subcutánea de células tumorales, los tumores se vascularizaban al llegar a los  $0.4 \text{ mm}^3$ . Al incrementar de tamaño, los vasos sanguíneos ocupaban el 1.5% del volumen tumoral. Esto representaba un incremento del 400% sobre el nivel de densidad vascular del tejido subcutáneo normal [14].

Esto dirigió un importante esfuerzo hacia la definición de los factores de crecimiento y mecanismos que intervienen en los procesos por medio de los cuales se crean nuevos vasos sanguíneos, lo cual permitió la concepción de estrategias para inhibir el fenotipo angiogénico para el tratamiento del cáncer y para otras enfermedades que también se caracterizan por el desarrollo descontrolado de vasos sanguíneos [16-29].

En el caso específico del cáncer, la inhibición del proceso de vascularización como estrategia terapéutica se sustenta en los siguientes puntos: la angiogénesis es un elemento central en todos los tumores sólidos, lo cual, en teoría, permitiría su aplicación en diversos tipos de tumores sólidos; la tasa de proliferación de la célula endotelial bajo estímulo tumoral es mayor a la de la célula endotelial sin estímulo, lo cual permitiría una toxicidad diferencial a las células endoteliales en mitosis; la célula endotelial estimulada expresa marcadores de superficie distintos a la célula endotelial en reposo, lo cual permitiría una toxicidad dirigida utilizando diferentes medios; dado que la célula endotelial no tiene alteraciones genéticas, el desarrollo de resistencia a la terapia sería menos probable; y finalmente, una célula endotelial nutre hasta 100 células tumorales, lo cual representa la posibilidad de potencialización terapéutica [12-17].

Los procesos angiogénicos se caracterizan por la generación de nuevos vasos sanguíneos en diversas situaciones fisiológicas y fisiopatológicas. Estos procesos son tres: 1) la angiogénesis, 2) la vasculogénesis y 3) la arteriogénesis. La angiogénesis es el proceso mediante el cual se generan nuevos capilares a partir de la microvasculatura pre-existente [30, 31]. La vasculogénesis ocurre durante el desarrollo embrionario y se define como la generación de vasos sanguíneos a partir de células troncales pluripotenciales [32-34]. El tercer

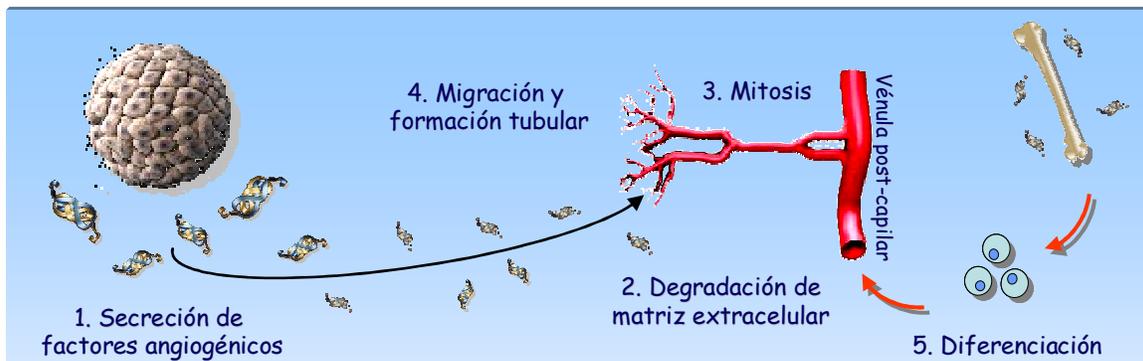
tipo de proceso angiogénico, la arteriogenesis, resulta de la maduración de nuevas arterias a partir de vasos sanguíneos colaterales pre-existentes [35-37].



**Figura 1. Balanza angiogénica.** El desarrollo de nuevos vasos sanguíneos resulta de una serie de eventos iniciados por el desequilibrio local entre factores de crecimiento pro y anti-angiogénicos. Figura adaptada de la referencia 51.

La angiogénesis es el resultado de una compleja cascada de eventos desencadenados por el desequilibrio local entre factores de crecimiento pro- y anti-angiogénicos (Figura 1). Los eventos centrales en el proceso de la angiogénesis comprenden: 1) la secreción de factores pro-angiogénicos por parte de diversas estirpes celulares (plaquetas, monocitos, linfocitos, células endoteliales, células tumorales), 2) la secreción de enzimas degradadoras de matriz extracelular por parte de la células endoteliales, 3) la entrada en mitosis de la célula endotelial, 4) la migración de las células endoteliales hacia el estímulo angiogénico con la posterior formación de estructuras tridimensionales tubulares, y 5) el reclutamiento de células troncales pluripotenciales provenientes de la médula ósea [31, 36, 38-47].

La masa tumoral en crecimiento induce un fenotipo angiogénico al desequilibrar localmente la concentración de factores pro- y anti-angiogénicos (Figura 2.) [41]



**Figura 2. Eventos principales de la angiogénesis tumoral.** La masa tumoral en crecimiento induce un fenotipo angiogénico al desequilibrar localmente la concentración de factores pro- y anti-angiogénicos. El mecanismo que desencadena dicho desequilibrio local se denomina “*switch angiogénico*” o “*interruptor angiogénico*”. La angiogénesis tumoral se caracteriza por una serie de pasos que comprenden: 1) la secreción de factores pro-angiogénicos por parte diversas estirpes celulares (plaquetas, monocitos, linfocitos, células endoteliales, células tumorales), 2) la secreción de enzimas degradadoras de matriz extracelular, 3) la entrada en mitosis de la célula endotelial, 4) la migración de las células endoteliales hacia el estímulo angiogénico con la posterior formación de estructuras tridimensionales tubulares, y 5) el reclutamiento de células troncales pluripotenciales provenientes de la médula ósea.

El mecanismo que desencadena dicho desequilibrio local se denomina “*switch angiogénico*” o “*interruptor angiogénico*” [48-54]. En el caso específico del cáncer, se han definido dos mecanismos por los cuales el interruptor angiogénico se activa: 1) mediante hipoxia y 2) por la activación constitutiva de oncogenes o por la pérdida de la función de genes supresores. En este sentido, cuando el tumor llega a un diámetro mayor a 1-2 milímetros y el oxígeno no es capaz de difundir por el tumor y sostener los requerimientos metabólicos de la masa en crecimiento, la hipoxia resultante estimula la secreción de factores angiogénicos [55-60]. Por otro lado, se ha documentado que la activación constitutiva de genes dominantes como Ras o Raf o bien mediante la pérdida de la función del gen supresor p53 incrementa la síntesis de factores angiogénicos [61-64].

Si bien la larga lista de factores angiogénicos secretados por la masa tumoral apunta hacia la idea de que la neutralización de un solo factor en un sistema redundante sería inútil desde una perspectiva terapéutica, los resultados de estudios en modelos animales y clínicos empleando diversas estrategias que inhiben la función de VEGF, demuestran el papel fundamental del grupo de factores de crecimiento del endotelio vascular en el crecimiento tumoral, por lo que se justifica continuar con el desarrollo de nuevas estrategias y compuestos para inhibirlos [65-68].

## LA FAMILIA DE FACTORES DE CRECIMIENTO DEL ENDOTELIO VASCULAR (VEGF)

### **Miembros e isoformas**

La familia de factores de crecimiento del endotelio vascular (VEGF), desde su descubrimiento en 1983 y de la posterior clonación del gen en 1989, ha surgido como el grupo de factores de mayor importancia en la formación de nuevos vasos sanguíneos, debido a que es esencial en la vasculogénesis embrionaria, en la angiogénesis asociada a procesos fisiológicos y en la angiogénesis asociada a cáncer y a otras patologías [30, 31].

La familia está constituida por VEGF-A, PlGF (Placental Growth Factor), VEGF-B, VEGF-C, VEGF-D y VEGF-E [69, 70]. El gen codificante para los miembros de la familia VEGF-A contiene 8 exones el cual es sometido a “empalmes alternativos” generando 8 diferentes transcritos nombrados de acuerdo con el número de aminoácidos que los constituyen: 110, 121, 145, 148, 165, 183, 189 y 206, [69-71] (Figura 3).

El VEGF-B fue descrito en 1995 y se expresa abundantemente en miocardio, músculo esquelético y páncreas. En el embrión de ratón, se observan niveles de expresión elevados durante el desarrollo del corazón, tejido adiposo, músculo y médula espinal. El VEGF-B cuenta con dos isoformas una de 167 aminoácidos y otra de 186 aminoácidos [72-74].

En el adulto, el VEGF-C se expresa predominantemente en corazón, placenta, ovario, intestino delgado, y tiroides. Durante el desarrollo embrionario el VEGF-C desempeña un papel central en el desarrollo del sistema linfático a partir de las venas embrionarias [74, 75].

Por otra parte, en el adulto, el VEGF-D se encuentra fundamentalmente en pulmón, músculo esquelético, colon, e intestino delgado. En el embrión, se encuentra principalmente en el pulmón en desarrollo [76, 77].

Se ha descrito que el gen de VEGF-E se encuentra en el genoma del virus Orf el cual al infectar la piel genera lesiones dérmicas caracterizadas por el desarrollo de angiogénesis patológica. El gen de VEGF-E es homólogo a sus contrapartes humanas en un 19% a 25% y genera un potente estímulo mitogénico en células endoteliales y de permeabilidad vascular semejante a sus contra partes humanas [77].

### **La estructura genómica de VEGF-A**

El gen codificante para VEGF-A se localiza, en el ser humano, en el cromosoma 6p21.3 y abarca aproximadamente 14 kilopares de bases [78, 79]. El gen está compuesto de 8 exones. Los exones 1 a 5 y 8 se encuentran en todas las isoformas, excepto en la isoforma 148. Los exones 1 a 5 codifican el dominio llamado “nudo de cisteína” (*cystein knot*), característico de la familia de VEGF [69, 70, 80, 81]. Los exones 6 y 7 codifican para dos dominios de

interacción con heparina; la presencia o ausencia de dichos exones, determinan tanto el grado de afinidad por sus receptores como su solubilidad. Por tal motivo las isoformas 145, 189, 183 y 206 se asocian fuertemente a la matriz extracelular compuesta de proteoglicanos ricos en heparina, y son menos solubles [31, 70, 82, 83].

La isoforma 165 contiene solo un dominio de asociación con heparina codificada en el codón 7, por lo tanto es moderadamente soluble. Mientras que las isoformas 121 y 110 carecen de ambos dominios, lo cual determina su elevada solubilidad. Las isoformas 145, 165, 189 y 206 asociadas a la matriz extracelular son liberadas en sus formas solubles bioactivas mediante proteólisis mediada por la liberación y activación de enzimas degradadoras de matriz extracelular [70, 83].



**Figura 3. Estructura genómica e isoformas del gen codificante de VEGF-A.** En el humano, el gen de VEGF-A se localiza en el cromosoma 6p21.3 y abarca aproximadamente 14 kpbs. El gen se compone de 8 exones. Los exons 1 a 5 codifican el dominio denominado “nudo de cisteína” (*cistein knot*) característico de la familia de VEGFs. Los exones 6 y 7 codifican dos dominios de interacción con heparina, la presencia o ausencia de dichos exones, determinan tanto el grado de afinidad por sus receptores como su solubilidad. Figura adaptada de la referencia 69.

## **Regulación de la expresión de los VEGFs**

Se han descrito tres mecanismos que regulan la transcripción de los VEGFs en situaciones fisiológicas: 1) hipoxia, 2) factores de crecimiento y citocinas y 3) hormonas.

**HIPOXIA:** El gen de VEGF cuenta con elementos de respuesta a hipoxia (*HRE-Hipoxia Responsive/Enhancer Elements*) situados en los extremos 5' y 3' del gen. La regulación de la transcripción de VEGF es mediada al unirse el factor transcripcional (*HIF-1-Hipoxia Inducible Factor*) a los HRE. El HIF-1 es un factor de transcripción que en condiciones de oxígeno normales tiene una alta tasa de degradación. Bajo condiciones hipóxicas el HIF-1 se acumula intracelularmente debido a una reducción en su ubiquitinación con lo cual se evita su degradación. La acumulación de HIF-1 en el citoplasma permite su translocación al núcleo donde se une a los HRE induciendo su transcripción. Otro evento generado por la hipoxia es el aumento de la vida media del ARNm de VEGF como resultado de la unión de factores no descritos al extremo 3' [55-60].

**FACTORES DE CRECIMIENTO Y CITOCINAS:** Se ha documentado que también los factores de crecimiento y citocinas inducen, tanto la expresión de VEGFs, como la activación de enzimas proteolíticas que liberan las isoformas asociadas de la matriz extracelular. El factor de crecimiento derivado de las plaquetas (PDGF) (*platelet derived growth factor*), el factor de necrosis tumoral alfa (TNF- $\alpha$ ) (*tumor necrosis factor alpha*), el factor de crecimiento transformante beta (TGF- $\beta$ ) (*transforming growth factor beta*), el factor de crecimiento de fibroblastos (FGF) (*fibroblast growth factor*) y el factor de crecimiento semejante a la insulina (IGF-1) (*insulin like growth factor*) [84-86], se encuentran entre los factores de crecimiento que generan dichos efectos. Por otro lado, las enzimas convertidoras

de ácido araquidónico a prostaglandinas y los tromboxanos, ciclo-oxigenasa 1 y 2 (COX-1, 2) inducen la secreción local de mediadores pro-inflamatorios como interleucina-1 (IL-1) e interleucina-6 (IL-6), las cuales a su vez inducen la secreción de VEGFs de monocitos y plaquetas. Así mismo, se ha observado que COX-2 induce directamente la transcripción de VEGF-A en células de cáncer colorectal (Caco-2) [84-86].

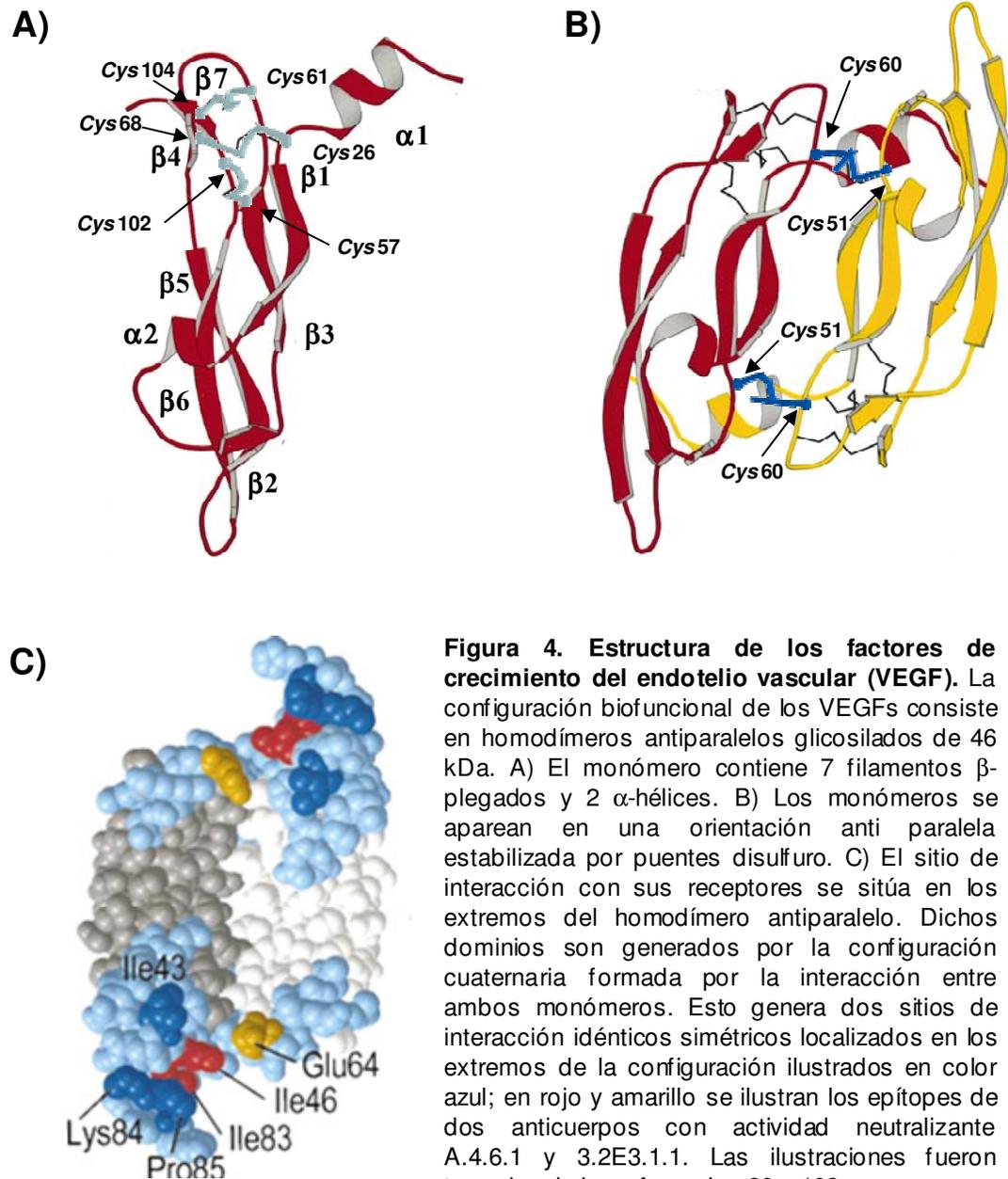
**HORMONAS:** Los estrógenos inducen la transcripción de VEGF-A en células de cáncer de mama (MCF-7). Adicionalmente, los progestágenos incrementan la expresión de VEGF-A en células tumorales de útero y de mama. En estudios realizados en células neoplásicas de próstata se documentó que la testosterona genera un incremento en la transcripción de VEGF-A [87, 88].

### **Estructura proteica de los VEGFs**

La configuración biofuncional de los factores de crecimiento del endotelio vascular (VEGFs) consiste en homodímeros antiparalelos glicosilados de 34 a 46 kDa (Figura 4). El monómero contiene 7 hojas  $\beta$ -plegadas y 2  $\alpha$ -hélices [47, 80, 81, 89, 90]. Dos estructuras llaman la atención en los VEGFs; 1) dos hélices generadas por el apareamiento anti-paralelo entre la hoja  $\beta$ -plegada 1 y la hoja  $\beta$ -plegada 3 y entre la hoja  $\beta$ -plegada 5 y la hoja  $\beta$ -plegada 6; y 2) un dominio llamado “nudo de cisteina” (*cystein knot*) estabilizado por 3 puentes disulfuro entre las *Cys26-Cys68*, *Cys57-Cys102* y *Cys61-Cys104*.

Los monómeros se aparean en una orientación anti-paralela estabilizada por puentes disulfuro entre las *Cys60-Cys51* [70, 80, 81, 89-92] (Figura 4). Se ha definido el sitio de interacción con sus receptores. Dichos dominios son generados por la estructura cuaternaria formada por la interacción de la  $\beta$ 2 y la  $\beta$ 5 y el giro  $\alpha$ 2- $\beta$ 2, del primer monómero y la hélice

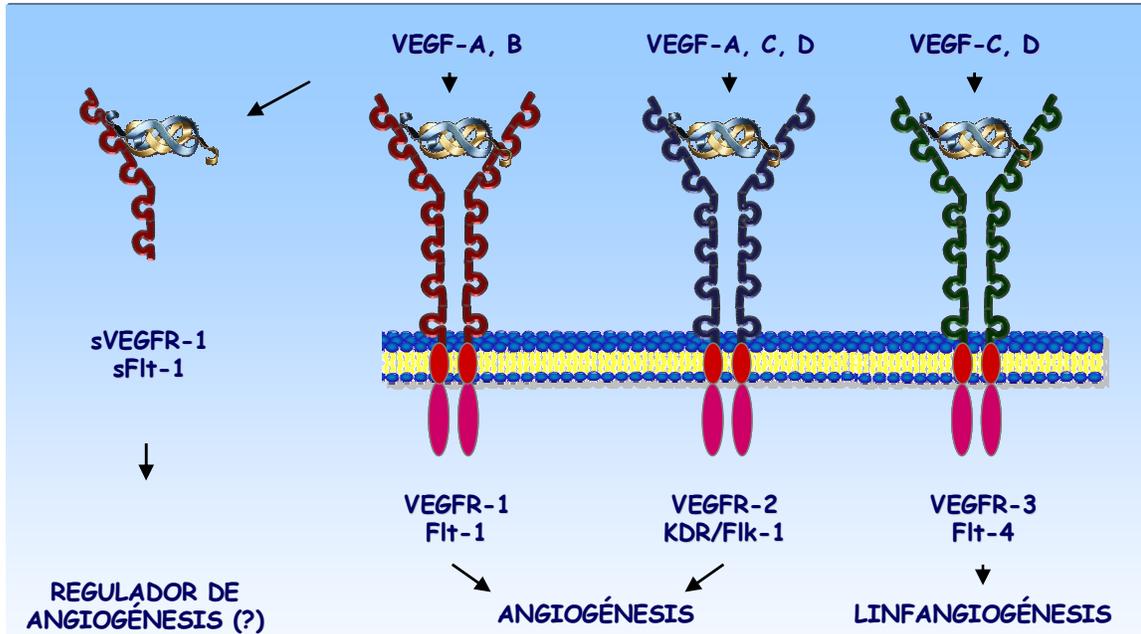
en el extremo amino y el giro  $\beta$ 3- $\beta$ 4 del segundo monómero [92, 93]. Esto genera dos sitios de interacción idénticos simétricos localizados en los extremos de la configuración homodimérica ilustrados en la figura 4.



## **Receptores para la familia de VEGFs**

La interacción con receptores específicos, los cuales presentan actividad de tirosina-cinasa, median las funciones de los factores de crecimiento del endotelial vascular [69, 70, 94, 95]. Cada isoforma de VEGF se une específicamente a tres receptores identificados actualmente: VEGFR-1(Flt-1), VEGFR-2 (KDR/Flk-1) y VEGFR-3 (Flt-4) ilustrados en la figura 5. El VEGF-A se asocia a los receptores VEGFR-1 (Flt-1) y VEGFR-2 (KDR/Flk-1). El VEGF-B se asocia únicamente a VEGFR-1, mientras que los factores VEGF-C y VEGF-D interactúan con los receptores VEGFR-2 y VEGFR-3 (Flt-4) (Figura 5).

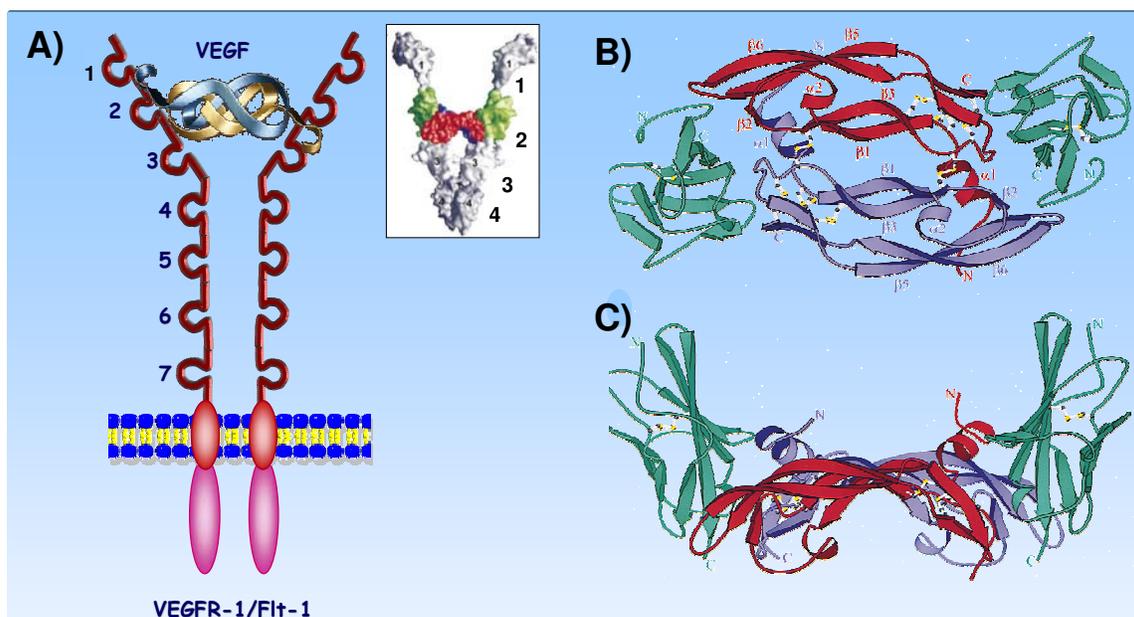
Parece ser que en los procesos de angiogénesis, el receptor VEGFR-2 tiene mayor importancia ya que su activación induce mitogénesis, motilidad endotelial y permeabilidad vascular, aunque presenta una menor afinidad por los factores VEGF. La función del receptor VEGFR-1 es menos clara, debido que su activación induce actividad de cinasa menos intensa, pero presenta una mayor afinidad por los VEGFs. Se ha propuesto que el receptor VEGFR-1 modula negativamente los procesos de vascularización patológica por lo que atenúa el efecto netamente angiogénico del receptor VEGFR-2, probablemente, a través de una forma soluble (sFlt-1) generada por un empalme alternativo o bien, por su baja actividad de cinasa [96, 97].



**Figura 5. Familia de receptores para los factores de crecimiento del endotelio vascular.** Las funciones de la familia de factores de crecimiento endotelial son mediadas por la interacción con receptores específicos. Cada isoforma de VEGF se une específicamente a tres receptores hasta la fecha identificados VEGFR-1(Flt-1), VEGFR-2 (KDR/Flk-1) y VEGFR-3 (Flt-4). El gen de VEGFR-1, genera una isoforma soluble mediante “splicing alternativo” (sFlt-1). Se ha propuesto que sFlt-1 desempeña una función reguladora en los procesos de vascularización.

Por otra parte, el receptor VEGFR-3 interviene exclusivamente en la linfangiogénesis [98, 99]. Los tres receptores tienen 7 dominios semejantes a inmunoglobulinas (*immunoglobulin-like domains*) en el dominio extracelular, una región transmembranal y un dominio con actividad de tirosina-cinasa en la región intracelular (Figura 6). El segundo dominio “*immunoglobulin-like*” es el responsable de la unión con los factores VEGFs. Los dominios 1, 3 y 4 son responsables de mantener la configuración espacial adecuada para unirse con los ligandos, mientras que los dominios 5 a 7 son indispensables para la fosforilación que inician la cascada de señalización [100-103]. Los receptores VEGFR-1 y 2 se expresan, primordialmente, en células endoteliales, aunque también se ha documentado su

presencia en células tumorales, osteoblastos, células del páncreas y en células de músculo liso[70].



**Figura 6. Estructura de los receptores para VEGF.** A) Los tres receptores: VEGFR-1, VEGFR-2 y VEGFR-3 tienen 7 dominios semejantes a inmunoglobulinas (*immunoglobulin-like domains*) en el dominio extracelular, una región transmembranal y un dominio con actividad de tirosina cinasa en la región intracelular. El segundo dominio *immunoglobulin-like* es el responsable de unión con los VEGFs. Los dominios 1, 3 y 4 son responsables de mantener la configuración espacial adecuada para su unión con VEGF; los dominios 4 a 7 son indispensables para iniciar la cascada de señalización. Cuadro: Vista lateral, Flt-1 en gris, dominio 2 en verde y VEGF en rojo y azul. B) Interacción entre VEGF (monómeros en rojo y morado) y el segundo dominio de Flt-1 (verde) visto de abajo hacia arriba desde la membrana celular. C) Vista lateral, con la membrana abajo, dominio 2 de Flt-1 (verde) y VEGF (rojo y morado). El recuadro de A y los modelos mostrados en los B y C fueron tomadas de la referencia 92.

### **Función de los factores de crecimiento del endotelio vascular (VEGFs)**

Estudios en ratones han determinado que durante el desarrollo embrionario, a partir del día siete, se induce la expresión de VEGF, la cual se mantiene así hasta declinar pocas semanas después del nacimiento [70]. La inactivación dirigida de un solo alelo produce la muerte del embrión entre los días 11-12 del desarrollo embrionario. Así mismo, se ha demostrado que la inactivación del VEGF en etapas posteriores al nacimiento, incrementa la tasa de mortalidad,

dado que se impide el crecimiento corporal y el desarrollo de los órganos, particularmente del hígado [70].

En el humano adulto no se presentan niveles altos de VEGF, con excepción de lechos vasculares selectos tales como el plexo coroide del cerebro, los alveolos en pulmón, el glomérulo del riñón y en corazón. El papel de VEGF es importante en los procesos de angiogénesis fisiológica, ya que se induce en procesos como el desarrollo del cuerpo lúteo durante el embarazo, en el ciclo endometrial y en la reparación de tejido [70]. En procesos patológicos asociados con exceso de vascularización como cáncer, artritis reumatoide y patologías de la retina, el VEGF-A se produce por diferentes tipos celulares tales como músculo liso, queratinocitos, macrófagos, monocitos y las células que componen la masa tumoral [47, 104-106].

### **VEGF como blanco terapéutico**

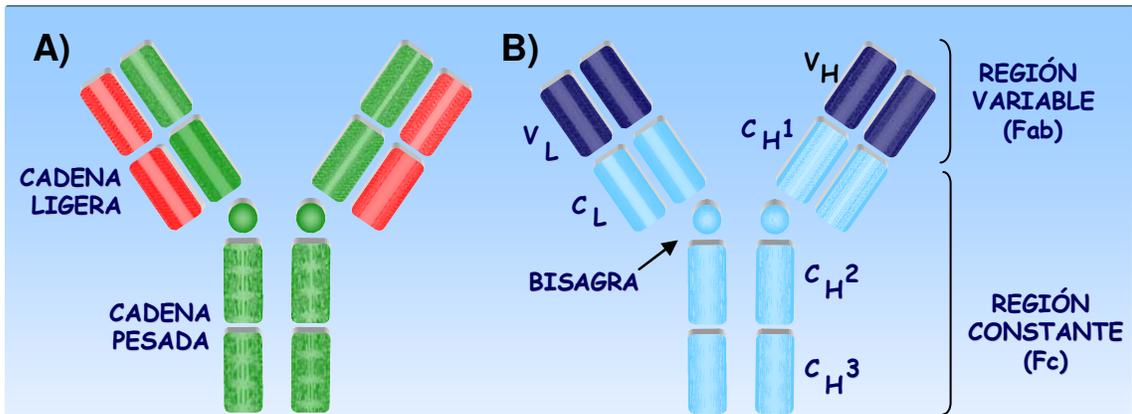
El reconocimiento del papel fundamental que desempeñan los VEGFs en el desarrollo de cáncer ha permitido proponer estrategias que pretenden bloquear su función. Dichas investigaciones han culminado en la aprobación de un anticuerpo dirigido contra este factor, este anticuerpo monoclonal humanizado denominado bevacizumab inicialmente se aprobó para el tratamiento de cáncer de colon metastásico y subsecuentemente se ha aprobado para otros tumores sólidos [67, 107, 108] . Es de importancia subrayar que la efectividad terapéutica en torno la inhibición de los diversos VEGFs debe estudiarse por separado en cada tipo tumoral.

## INMUNOGLOBULINAS Y SU EMPLEO EN LA TERAPÉUTICA MÉDICA

En la mayoría de las áreas de la investigación biomédica se ha empleado la especificidad y alta afinidad que caracterizan a las inmunoglobulinas para identificar o bien interrumpir la función de proteínas. Los avances en el área de la inmunología molecular y en la biología molecular han permitido extender la aplicación y el diseño de las inmunoglobulinas, no sólo como herramientas para la investigación biomédica, sino también para su aplicación en la terapéutica médica [109, 110]. La comprensión de los mecanismos moleculares que generan la estructura proteica de los anticuerpos es el fundamento del diseño y generación de anticuerpos sintéticos. Una alternativa es el empleo de los anticuerpos de cadena sencilla como una herramienta para inhibir VEGF [109-112]

### **Estructura y función de las inmunoglobulinas**

Estructuralmente, las inmunoglobulinas son complejos proteínicos tetraméricos plasmáticos los cuales configuran una "Y". Estos complejos son producidos por linfocitos B en respuesta al reconocimiento de moléculas foráneas y están constituidas por dos cadenas pesadas cada una de aproximadamente 50 kDa de peso molecular (H = heavy) y dos ligeras de 25 kDa (L = light) (Figura 7). Funcionalmente, el anticuerpo se encuentra dividido en dos regiones: la región variable (V) que confiere al anticuerpo la capacidad de interacción con la molécula que inició la respuesta inmune y la región constante (C), que la unirse a los receptores Fc inicia diversas respuestas inmunes y que recluta células efectoras del sistema inmune para la subsecuente destrucción del patógeno que inició la respuesta [111, 112]. (Figura 7)



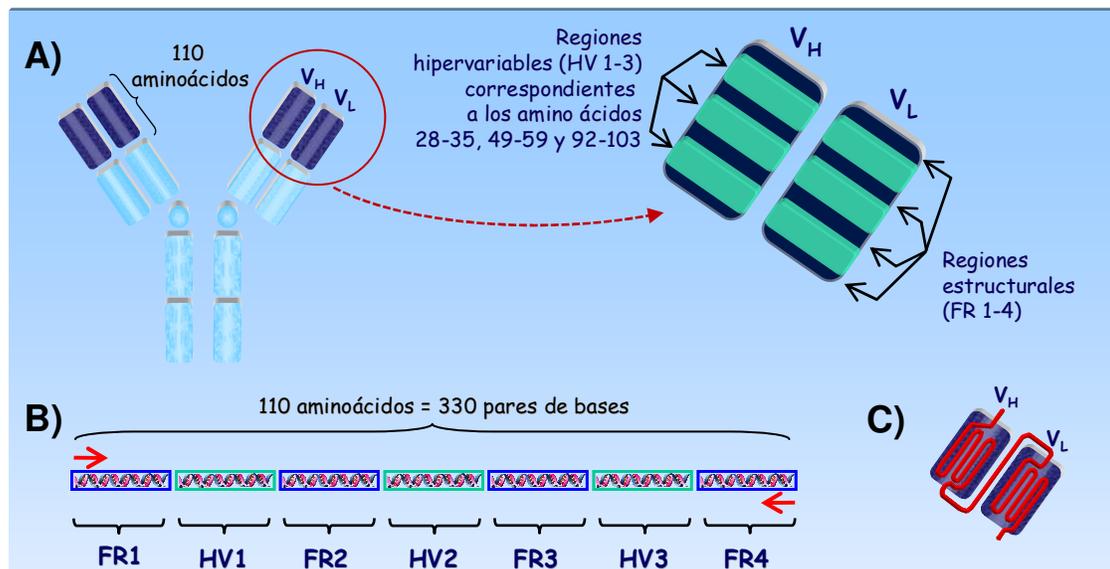
**Figura 7. Estructura general de las inmunoglobulinas.** A) Estructuralmente, las inmunoglobulinas son complejos proteicos multiméricos plasmáticos los cuales configuran una "Y", son producidas por linfocitos B en respuesta al reconocimiento de moléculas foráneas y están constituidas por dos cadenas pesadas (verde) y dos ligeras (rojo). B) Funcionalmente, el anticuerpo se encuentra dividido en dos regiones, la región variable (V-azul marino) que confiere al anticuerpo la capacidad de interacción con la molécula que inició la respuesta inmune y la región constante (C-azul claro) que inicia diversas respuestas inmunes y que recluta células efectoras del sistema inmune para la subsecuente destrucción del patógeno que inició la respuesta.

Los anticuerpos son agrupados en cinco clases o isotipos (IgA, IgD, IgE, IgG y IgM) de acuerdo con diferencias en la secuencia aminoacídica de la región constante de la cadena pesada, el número y posición de los puentes disulfuro que estabilizan a las cadenas pesadas y ligeras, a la presencia de una región con función de bisagra, el número de regiones constantes de la cadena pesada y el número y posición de oligosacáridos en las cadenas pesadas. Cada isotipo es responsable de diversas funciones inmunológicas y cuentan como vidas medias plasmáticas que van de 2 a 3 días (IgD, IgE) a 21 días (IgG) [110-112].

### **Estructura de la región variable y diversidad molecular**

La capacidad del sistema inmune de generar un número ilimitado de anticuerpos para el reconocimiento de cualquier estructura en un tiempo reducido es extraordinaria. Dicho fenómeno es posible debido a mecanismos moleculares específicos de los linfocitos B los cuales les permiten generar regiones variables con una diversidad molecular infinita [111,

112]. La variabilidad estructural se encuentra en los primeros 110 aminoácidos de las regiones variables de las cadenas pesadas y ligeras. (Figura 8) Las regiones variables están constituidas por dos regiones estructuralmente bien definidas: 1) las regiones hipervariables (HV1, HV2 y HV3), también denominadas regiones determinantes de complementaridad (CDR= *complementarity determining regions*), correspondientes a los residuos 28 a 35 (HV1), 49 a 59 (HV2) y 92 a 103 (HV3) y 2); las regiones estructurales (FR = *framework regions*, FR1, FR2, FR3, FR4) [111, 112].



**Figura 8. Organización estructural y genómica de la región variable de las inmunoglobulinas.** A) La variabilidad estructural de los anticuerpos que permite generar un número ilimitado de anticuerpos se encuentra en los primeros 110 amino ácidos de las regiones variables de las cadenas pesadas y ligeras. Dichas regiones variables están constituidas por dos regiones estructuralmente bien definidas: 1) las regiones hipervariables (HV1, HV2 y HV3) también denominadas regiones determinantes de complementaridad (CDR= *complementarity determining regions*) correspondientes a los residuos 28 a 35 (HV1), 49 a 59 (HV2) y 92 a 103 (HV3) y 2) las regiones estructurales (FR = *framework regions*, FR1, FR2, FR3, FR4). Los dominios generados por la interacción de tanto las regiones CDR como las FR de las cadenas ligeras y pesadas configuran los sitios que interactúan con el antígeno. B) Las secuencias nucleotídicas que codifican las regiones FR flanqueantes son relativamente conservadas, esto hace factible el diseño de oligonucleótidos (flechas rojas) para su amplificación por PCR y manipulación mediante técnicas convencionales de biología molecular para diversos usos incluyendo la generación de anticuerpos de cadena sencilla (scFv) (C).

La interacción de las regiones CDR con las FR de las cadenas ligeras y pesadas configuran los dominios que interactúan con el antígeno [111, 112]. A nivel genómico, las secuencias nucleotídicas que codifican las regiones FR flanqueantes son relativamente conservadas, esto hace factible el diseño de oligonucleótidos (*primers*) para su amplificación mediante RT-PCR y posterior manejo a través de técnicas convencionales de biología molecular para diversas aplicaciones incluyendo la generación de anticuerpos de cadena sencilla (scFv) [113-116].

### **Inactivación de oncoproteínas mediante anticuerpos de cadena sencilla (scFvs) y perspectivas**

Recientemente, se ha estudiado y propuesto la aplicabilidad de los scFvs para detener la función de las oncoproteínas, ya que uno de los elementos centrales en la biología del cáncer es la expresión anormal de proteínas que confieren el fenotipo maligno. En este sentido, se ha documentado que el bloqueo de la función de oncoproteínas empleando scFvs es factible, con lo cual se han observado efectos anti-tumorales importantes [110, 113-121]. Adicionalmente, se han descrito otras aplicaciones que amplían el horizonte de su aplicación en la terapéutica médica [122]. Al parecer existen pocas limitantes para la aplicación de dicha tecnología si bien hay áreas que deben investigarse más. Por ejemplo, en caso de scFvs solubles es necesario caracterizar su vida media plasmática [121, 123]. En el contexto de scFvs con actividad intracelular se debe continuar con los esfuerzos para mejorar los índices de transducibilidad tumoral, con el objeto de que puedan transducirse todas, o en su defecto, el mayor número posible de las células que constituyen la masa tumoral y se logre un efecto anti-tumoral importante [117, 120, 123].

## LA TRANSGÉNESIS TERAPÉUTICA DEL CÁNCER

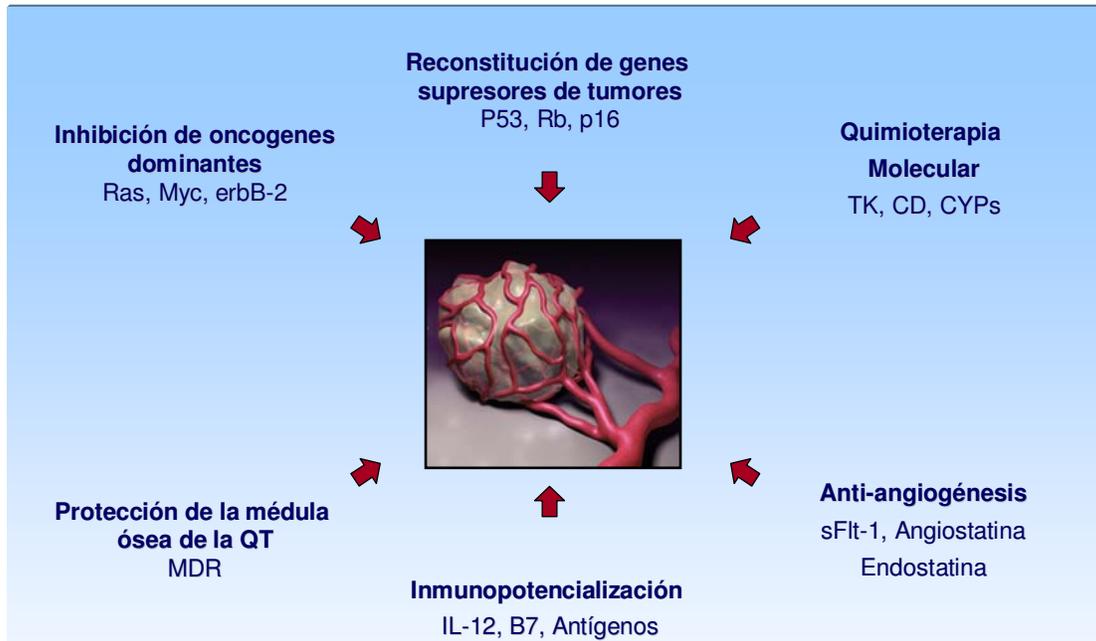
Los avances en el entendimiento de los principios biológicos de el origen y progresión de las enfermedades neoplásicas ha dado como resultado la identificación de alteraciones genéticas y epigenéticas responsables de la carcinogénesis [1-4, 124-126]. La caracterización de dichas alteraciones moleculares permite el diseño de una nueva generación de estrategias farmacológicas que pretenden mejorar la terapéutica oncológica.

Dentro de las propuestas innovadoras en la terapéutica oncológica se encuentran anticuerpos monoclonales dirigidos contra factores de crecimiento [107, 127, 128], se han sintetizado compuestos inhibidores de tirosina cinasas [129, 130], se han descrito fármacos con efectos epigenéticos [131, 132] y se han propuestos estrategias de transgénesis terapéutica o terapia génica [133-136].

La transgénesis terapéutica se define como un grupo de estrategias versátiles mediante las cuales se utilizan ácidos nucleicos específicos con el propósito de complementar y mejorar los esquemas convencionales de tratamiento médico [137-150]. La transgénesis terapéutica del cáncer comprende, entonces, un conjunto de estrategias que intervienen en los procesos que caracterizan a la patología molecular del cáncer con la finalidad de detener el fenotipo maligno, o bien propiciar la muerte de la célula tumoral [107, 133-136].

El diseño de estrategias que proponen a la transgénesis para el tratamiento del cáncer se sustentan en: 1) el conocimiento de las alteraciones moleculares que caracterizan al cáncer y que definen los blancos moleculares, 2) el desarrollo de “herramientas” que permiten intervenir intra o extracelularmente con el objeto de modular o corregir dichas alteraciones moleculares, y 3) el desarrollo de vehículos (vectores) y estrategias anatómo-quirúrgicas de

entrega que permitan llevar hasta las células que comprenden la masa tumoral dichas herramientas, con el fin de que interactúen con sus blancos moleculares y ejerzan su efecto antineoplásico [133-136, 151].



**Figura 9. La transgénesis terapéutica del cáncer.** Dado que el cáncer se desarrolla en etapas molecularmente definidas y a que se han identificado las alteraciones genéticas y epigenéticas responsables, la transgénesis terapéutica del cáncer se enfoca en inhibir, restaurar o bien modular cada una de las alteraciones que definen la patología molecular del cáncer así como también estrategias para potenciar el efecto citotóxico de quimioterapéuticos convencionales. Dentro de las estrategias propuestas se encuentran la inhibición de genes dominantes, la reconstitución de genes supresores de tumores, la inmunopotencialización, el uso de genes activadores de proteínas tóxicas y la inhibición de la angiogénesis.

Hasta la fecha, las diversas estrategias de transgénesis terapéutica propuestas para al cáncer, se enfocan en inhibir, restaurar o bien modular cada una de las alteraciones que definen la patología molecular del cáncer, además de potenciar el efecto de quimioterapéuticos convencionales [133-136, 151]. De tal forma que un grupo de estrategias se dedica a detener las señales intracelulares que promueven la división celular, por lo que los blancos son los productos de oncogenes dominantes que han sido activados constitutivamente. A este grupo de estrategias se les denomina “*inhibición de oncogenes*”. También se ha propuesto la

“reconstitución de genes supresores de tumores” con el fin de restablecer el control mitótico que estos ejercen [152-154]. Otras estrategias sugeridas son las que re-establecen la capacidad del sistema inmune de reconocer las células neoplásicas, estas estrategias son denominadas como “*inmunopotencialización génica*” [155, 156], por otra parte, se ha propuesto la potencialización de quimioterapéuticos convencionales y el uso de pre-toxinas para inducir la muerte de células tumorales mediante el uso de genes codificantes para enzimas activadoras de prodrogas “*genes suicidas*” [157-159] y finalmente, se han descrito diversas estrategias que tienen como blanco detener el desarrollo del árbol vascular tumoral a través de metodologías de transgénesis [22, 29, 151, 153, 160-165].

### **Anti-angiogénesis tumoral y terapia génica**

En la década de los 70 Judah Folkman propuso que el crecimiento tumoral es angio-dependiente [12]. Esta hipótesis se corroboró en los años 80, al grado que actualmente se ha establecido como una constante universal en la biología de los tumores sólidos y en el desarrollo de lesiones metastásicas [13-15]. Lo anterior ha dirigido una considerable atención hacia la definición de los mecanismos y factores de crecimiento que intervienen en la generación de nuevos vasos sanguíneos. La definición de esta biología ha permitido el descubrimiento de diversos compuestos y péptidos que pretenden detener el crecimiento tumoral y el desarrollo de enfermedad metastásica mediante la inhibición del fenotipo angiogénico. Dichos compuestos y estrategias anti-angiogénicas funcionan debido a que se inhibe la proliferación de las células endoteliales, se inhiben su migración o bien, se inducen apoptosis [166-170].

Los resultados del empleo de diversos inhibidores de angiogénesis en ensayos clínicos han fundamentado la base conceptual y experimental para justificar nuevos ensayos clínicos utilizando los mismos péptidos pero ahora desde una plataforma basada en la transgénesis [22, 151, 153, 161-163, 165]. (Figura 10).



**Figura 10. Estrategias anti-angiogénicas mediante transgénesis.** Las estrategias anti-angiogénicas mediante transgénesis comprenden dos enfoques principalmente: 1) la inhibición de la secreción de factores angiogénicos y 2) la transducción de genes codificantes de proteínas inhibidoras de la angiogénesis.

Entre los argumentos que sustentan el uso de terapia génica para inhibir la angiogénesis tumoral se encuentran: 1) la estabilidad genética relacionada con la célula endotelial, lo que podría reflejarse en la menor posibilidad de desarrollo de resistencia; 2) dado que el desarrollo de neo-angiogénesis es un componente central en la biología de los tumores sólidos, las estrategias serían aplicables a todos los tumores sólidos; 3) el potencial de una secreción prolongada, tanto local como sistémica; 4) viabilidad fármaco-económica, ya que el costo de la infusión crónica de péptidos anti angiogénicos obtenidos mediante biotecnología convencional sería prohibitivo; y 5) la posibilidad de utilizar “cassettes” de expresión codificantes para múltiples péptidos con propiedades anti-angiogénicas, ya que la

infusión crónica de mezclas o “*cocktailes*” de compuestos de múltiples péptidos con propiedades anti-angiogénicas es una situación clínicamente poco probable [22, 162, 163, 165, 171]. En el momento de escribir este trabajo, las estrategias anti-angiogénicas mediante tansgénesis tienen principalmente dos enfoques, 1) la inhibición de la secreción de factores angiogénicos y 2) la tansducción de genes que producen la síntesis local o sistémica de péptidos inhibidores de la angiogénesis.

La inhibición de la secreción de factores angiogénicos ha sido estudiada mediante oligonucleótidos anti-sentido, ribozimas, y RNAs de interferencia (SiRNAs) “*small interfering RNA*”, ambos dirigidos a la inhibición de la síntesis o expresión de las diversas isoformas de VEGF-A [66, 67, 172-175]. Por otro lado, se ha estudiado el efecto anti-angiogénico y anti-neoplásico de inhibidores endógenos, como la isoforma soluble del receptor de VEGF (sFlt-1), la endostatina y la angiostatina entre otros [162, 165, 167, 169, 172, 176-178]. Vectoriológicamente se han utilizado estrategias basadas en liposomas, en inyección intramuscular directa de ADN desnudo, así como en diversos sistemas virales [179, 180].

## EL ADENOVIRUS COMO VECTOR EN LA TERAPIA GÉNICA

La viabilidad de la aplicación clínica rutinaria de la terapia génica somática depende y dependerá del desarrollo de sistemas transportadores del ácido nucleico terapéutico al tejido blanco [181, 182]. A esta área de la transgénesis terapéutica se le denomina “vectorología”. El vector ideal deberá contar con una serie de requisitos definidos por la patología a tratar [182]. En términos generales, el vector ideal debe producirse con facilidad y en grandes cantidades, la tropicidad del vector debe ser restringida al grupo de células blanco tratadas y a su vez, lograr una transducción eficiente. En el nivel molecular, el vector ideal debe ser diseñado con las secuencias génicas necesarias para obtener la expresión que generen niveles terapéuticos de la proteína en cuestión, que mantenga la expresión del cDNA terapéutico por el tiempo óptimo dictado por la patología a tratar y, finalmente, deberá ser poco inmunogénico. [183-186]. (Tabla 6). Los métodos para el transporte de genes con potencial terapéutico se dividen en dos grupos: 1) los métodos no-virales y 2) los métodos virales; ambos con propiedades distintas y resumidos en la tabla 1.

TABLA 1. PROPIEDADES DE LOS VECTORES EN LA TERAPIA GÉNICA

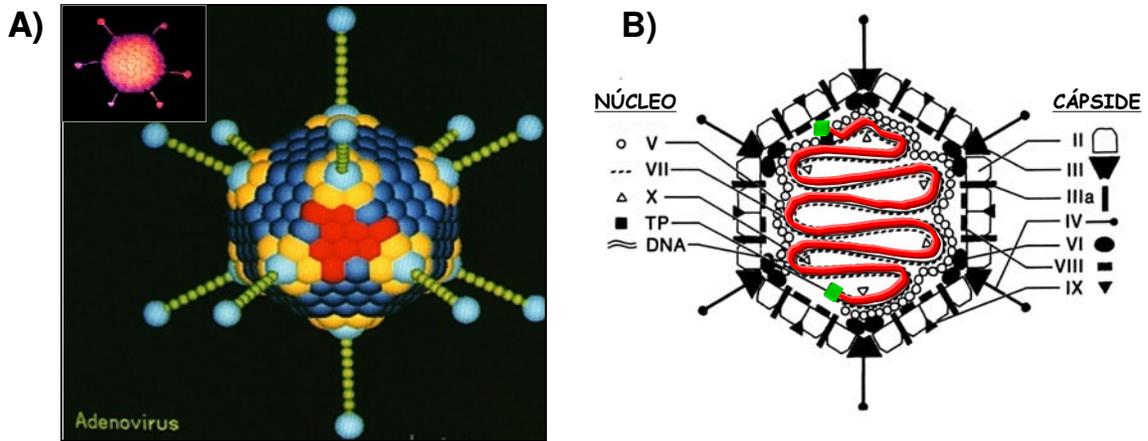
VECTOR	<i>IN VIVO</i>	<i>IN VITRO</i>	EFICIENCIA DE TRANSFECCIÓN	DURACIÓN DE EXPRESIÓN
<b>Inyección directa de DNA</b>	SI	NO	NO APLICABLE	Transitoria
<b>Electroporación</b>	SI	SI	<5%	Transitoria
<b>Liposomas</b>	SI	SI	50-60%	Transitoria
<b>Retrovirus</b>	SI	SI	<5%	Estable
<b>Adenovirus</b>	SI	SI	95%	Transitoria
<b>Adeno-Asociados</b>	SI	SI	60-80%	Estable

Las propiedades físico-químicas de los métodos no virales definen sus características transportadoras, entre estos métodos se encuentra la inyección directa de ADN desnudo, el uso de liposomas, el uso de partículas pesadas cubiertas con ácidos nucleicos (*gene gun*) y la electroporación [187]. Por otro lado, también se han utilizado diversos virus como vectores acarreadores de genes con potencial terapéutico. A la fecha, los virus más utilizados para estudios de terapia génica son los adenovirus, virus adenoasociados, retrovirus y herpes virus [181]. La presente tesis se enfoca en el uso de adenovirus como vectores por lo cual a continuación se describe la biología de los vectores adenovirales.

## **Biología de los Adenovirus**

### **Estructura y genoma del adenovirus**

Los adenovirus son miembros de la familia *Adenoviridae*, la cual se caracteriza por su capacidad de infectar células post-mitóticas, incluyendo células altamente diferenciadas como: células endoteliales, hepatocitos, fibroblastos, músculo esquelético, músculo cardíaco, neuronas y pulmón [183, 188-191]. La familia *Adenoviridae* se divide inmunológicamente en 50 serotipos. Los serotipos 2 y 5 han sido los más estudiados para ensayos de transgénesis terapéutica. La cápside del adenovirus es de forma icosaédrica, con un diámetro de 70 a 100 nm y está compuesta de tres proteínas, la hexona, la base pentona (III), y la fibra (IV). En su interior contiene las proteínas denominadas VI, VIII, IX, IIIa, y IVa2. El genoma adenoviral consiste de 36 kpbs de ADN lineal de doble hebra con terminaciones repetitivas invertidas “ITRs” (*Inverted Terminal Repeats*) [192-195]. (Figura 11)



**Figura 11. Estructura adenoviral.** A) Los adenovirus son de forma icosaédrica y miden de 70 a 100 nm de diámetro. La cápside esta compuesta de tres proteínas principales, la hexona (II), la base pentona (III), y la fibra (IV). En el interior contienen proteínas secundarias denominadas VI, VIII, IX, IIIa, y IVa2. B) El genoma de los adenovirus consiste de 36 kpbs de ADN lineal de doble cadena (rojo) con “terminaciones repetitivas invertidas” (ITRs) unidas a proteínas de terminación (verde).

### Ciclo de vida adenoviral

El ciclo de vida del adenovirus silvestre se divide en dos fases: la fase temprana y la fase tardía. La fase temprana (*early phase*) toma de 6 a 8 horas posteriores a la infección e incluye la interacción del adenovirus con los receptores específicos, la entrada del virus a la célula mediante la formación del endosoma y la posterior liberación de éste; el transporte del virus a través del citoplasma, seguido de la inyección del genoma viral al núcleo y finaliza con la transcripción de los genes “tempranos” (*early genes*: E1, E2, E3, E4). La fase temprana de la infección adenoviral se centra en preparar a la célula para la replicación del genoma viral y para la subsecuente transcripción de los genes tardíos (*late genes*: L1, L2, L3, L4 y L5).

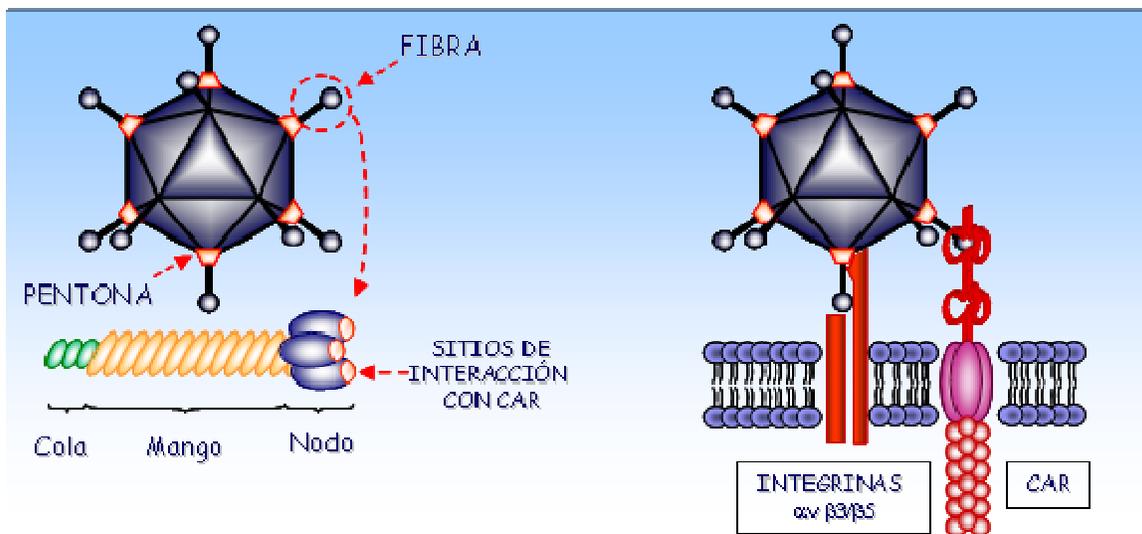
La fase tardía (*late phase*) toma de 4 a 6 horas y comprende la transcripción de genes tardíos codificantes para las proteínas estructurales del virus, el ensamblaje de las partículas virales hasta su maduración y, finalmente, la liberación de las nuevas partículas virales al medio [196-198].

El gen E1, el cual a su vez se divide en dos productos: E1A y E1B, es la piedra angular del ciclo de vida adenoviral ya que prepara a la célula para la transcripción y subsecuente replicación del genoma adenoviral y activa la transcripción de los genes tardíos a través de la transactivación de E2.

La expansión *in vitro* de adenovirus recombinantes con delección en la región E1A depende de que este gen sea transcomplementado en una célula que contenga dicho gen integrado establemente en su genoma. Las células 293, 911 y PER.C6 establemente transformadas con el gen E1, son las que llevan a cabo esta función [199-204].

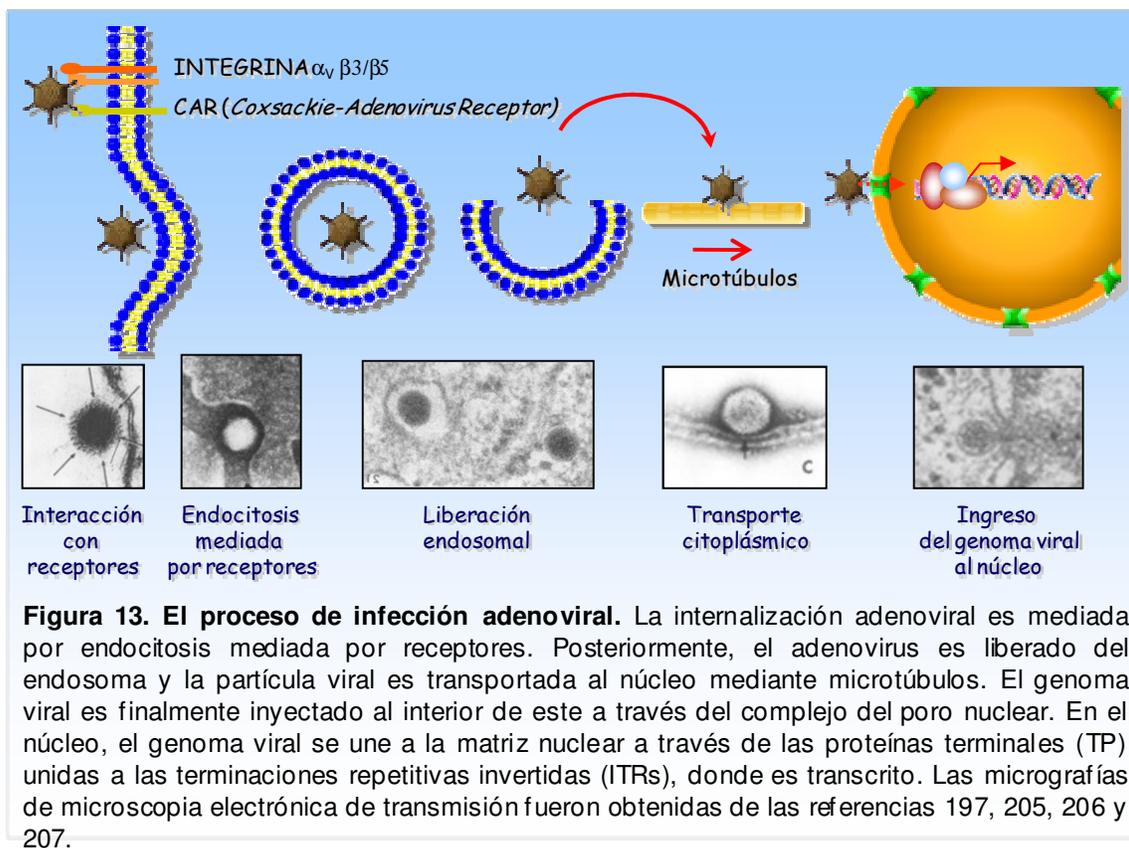
### Proceso de infección adenoviral

La infección adenoviral es mediada por la interacción entre el nodo (*knob*) situado en el extremo amino de la fibra y el receptor putativo denominado CAR (*Coxsackie/Adenovirus Receptor*) y entre la proteína pentona situada en la base de la fibra (*penton*) con las integrinas  $\alpha$ V- $\beta$ 3 o  $\alpha$ V- $\beta$ 5 como se ilustra en la Figura 12 [205-212].



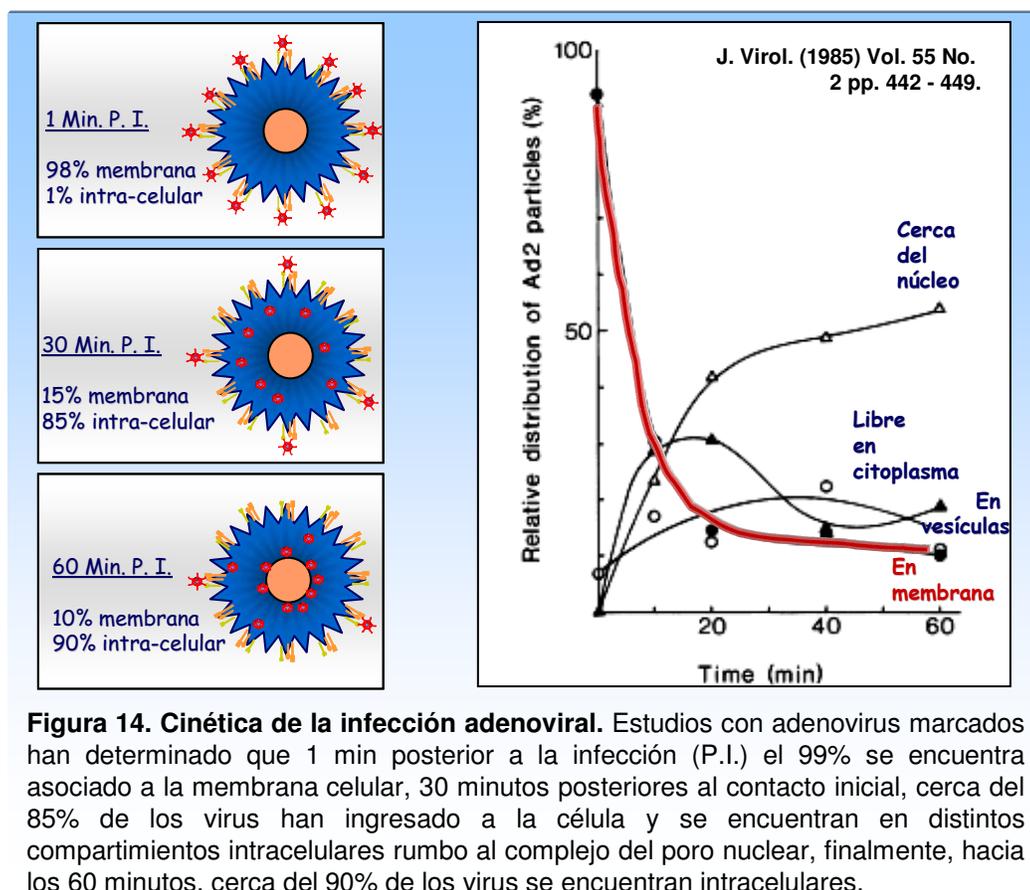
**Figura 12. La cápside adenoviral y los receptores involucrados en el proceso de infección.** La infección adenoviral depende de la interacción del nodo (*knob*) situado en la fibra y la proteína pentona (*penton*) con el receptor CAR (*Coxsackie/Adenovirus Receptor*) y con las integrinas  $\alpha$ V $\beta$ 3 y  $\alpha$ V $\beta$ 5 respectivamente.

El virus es internalizado a la célula mediante la formación de endosomas y posteriormente es liberado al citoplasma. La cápside viral es transportada al núcleo a través del citoplasma, para ello emplea el sistema de microtúbulos, donde finalmente el genoma viral es inyectado al interior del núcleo a través del complejo del poro nuclear. En el núcleo, el genoma viral se une a la matriz nuclear vía las proteínas terminales unidas a las terminaciones repetitivas invertidas (ITRs), donde se mantiene en forma episomal [213]. (Figura 13)



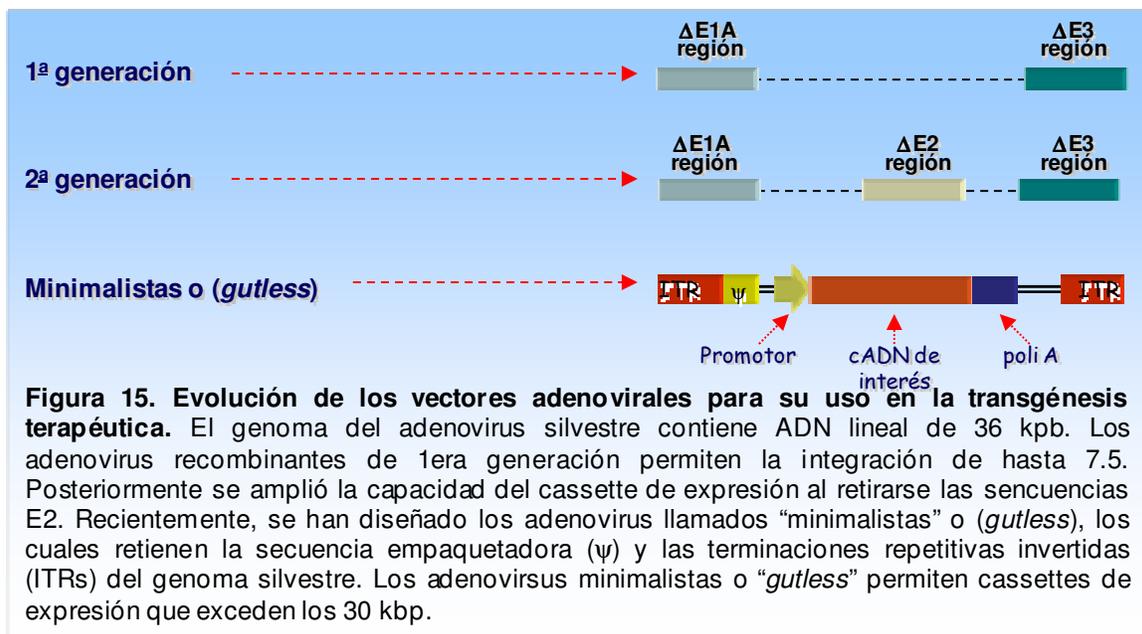
## Cinética de la infección adenoviral

Estudios con adenovirus marcados radioactivamente han establecido que 1 minuto posterior a la infección el 99% se encuentra asociado a la membrana celular, 30 minutos posteriores al contacto inicial, 80% de los virus han ingresado a la célula y se encuentran en distintos compartimentos rumbo al complejo del poro nuclear. Finalmente, hacia los 60 minutos, cerca del 90% de los virus se encuentran en el citoplasma [197]. Es de interés mencionar que, si bien en cultivo esta variable es de gran importancia para lograr perfiles de eficiencia de transducción que en células como HeLa se acerca al 100%; *in vivo* no existen estudios que evalúen el efecto del tiempo que se otorga para permitir la interacción entre el virus y sus receptores en la célula blanco sobre los perfiles de transducción. Esto se debe a la ausencia de modelos experimentales que permitan manipular dicha variable. (Figura 14)



## Evolución de los vectores adenovirales para su uso en la terapia génica

El genoma del adenovirus silvestre está constituido por 36 kbps de ADN lineal de doble hebra. Inicialmente, los adenovirus de primera generación permitían la incorporación de hasta 7.5 kilopares de bases correspondientes al cassette de expresión codificante para el gen de interés, al retirar las secuencias correspondientes a los genes E1A y E3. Posteriormente, se retiraron las secuencias correspondientes al gen E2 y se amplió la capacidad del cassette. Más adelante, se generaron los adenovirus “minimalistas” o “destripados” (*gutless*) los cuales retienen solamente la secuencia empaquetadora ( $\psi$ ), y las terminaciones repetitivas invertidas (ITRs) del genoma adenoviral silvestre. Estos adenovirus requieren de ADN de “relleno” y permiten cassettes de expresión que exceden los 30 kilopares de bases. La última generación de adenovirus recombinantes, emplea adenovirus a los que se ha reintegrado el gen E1 al genoma y mediante diversas estrategias se replican selectivamente en células tumorales. El efecto antitumoral se debe a que el ciclo de vida adenoviral es lítico [192, 213-216] (Figura 15).



La viabilidad de la aplicación clínica de la terapia génica somática en forma rutinaria depende del desarrollo de sistemas transportadores eficientes del ácido nucleico terapéutico al tejido blanco. La evolución de los vectores adenovirales aún debe resolver algunos obstáculos, entre los cuales se encuentran, la disminución de la inmunogenicidad adenoviral, el prolongar la expresión del gen terapéutico y mejorar los perfiles de transducción *in vivo* [194, 195, 217, 218].

## JUSTIFICACIÓN

El cáncer es un problema de salud pública a escala mundial. Debido a que el cáncer es ahora la segunda causa de muerte en México, es necesario que se concreten programas globales enfocados a la problemática oncológica, los cuales tendrían que contemplar, estudios epidemiológicos, educación, diagnóstico temprano, investigación básica e investigación preclínica para el desarrollo de nuevas estrategias y compuestos terapéuticos que ofrezcan alternativas al paciente que padece de cáncer.

## OBJETIVO GENERAL

Diseñar una estrategia de transgénesis mediante adenovirus recombinantes para inhibir la secreción de VEGF-165 humano, para su aplicación en cáncer de vejiga y en diversos tumores sólidos.

## OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Generar un anticuerpo de cadena sencilla contra el factor de crecimiento del endotelio vascular isoforma 165 humano (Hu-VEGF-165).
2. Evaluar la inhibición de Hu-VEGF-165 mediante el anticuerpo de cadena sencilla.
3. Generar un adenovirus recombinante con un anticuerpo de cadena sencilla contra el factor de crecimiento del endotelio vascular.
4. Determinar la transducibilidad adenoviral en líneas celulares de cáncer de vejiga murinas y humanas.
5. Determinar la transducibilidad adenoviral en cultivo primario de urotelio humano.
6. Determinar la transducibilidad adenoviral del tejido genito-urinario en modelos murinos *in vivo*.

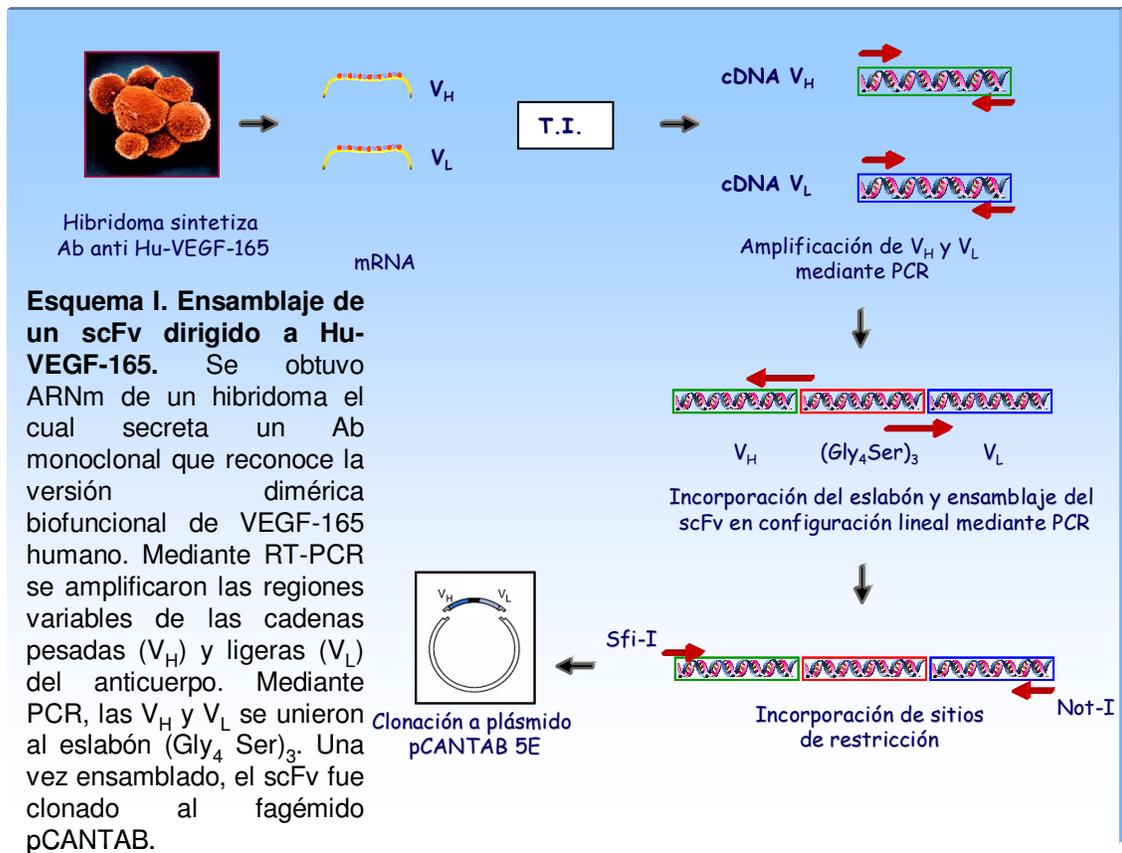
## HIPÓTESIS

Si se expresa en líneas celulares tumorigénicas secretoras de VEGF-165 un anticuerpo de cadena sencilla con afinidad por VEGF-165 y con una secuencia de retención en retículo endoplásmico, entonces la interacción intracelular de ambos inhibirá la secreción de VEGF-165.

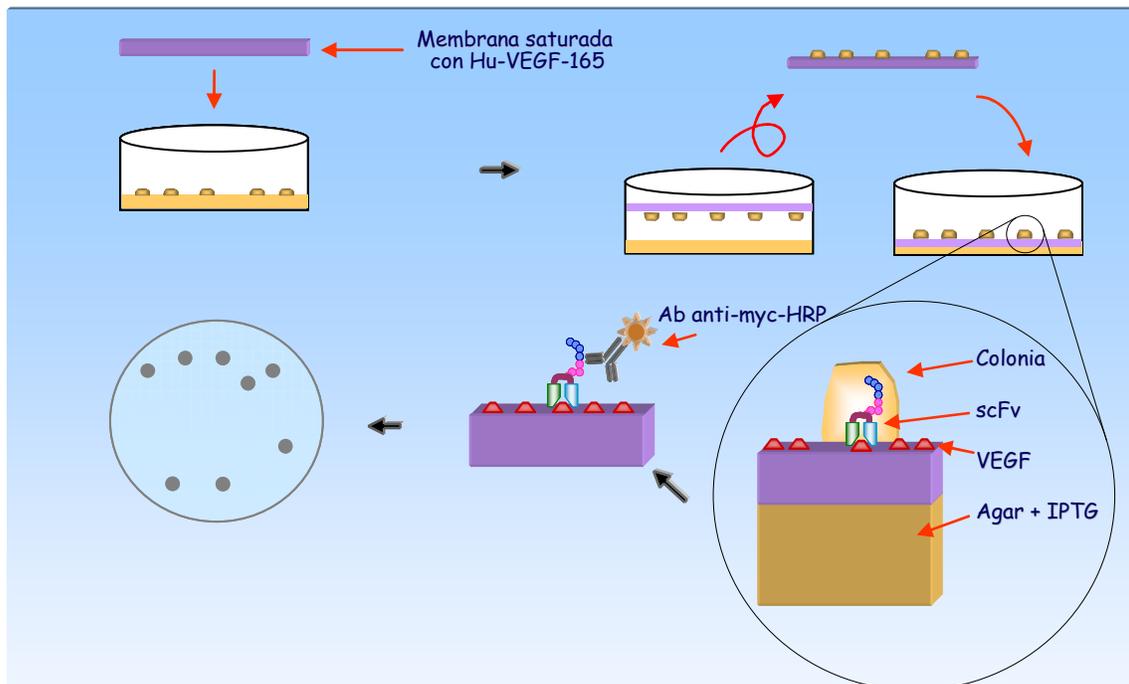
## MATERIALES Y MÉTODOS

### Ensamblaje y caracterización funcional del anticuerpo intracelular de cadena sencilla

ENSAMBLAJE: Se obtuvo ARN mensajero (ARNm) de un hibridoma que genera un anticuerpo contra la isoforma 165 del VEGF humano (Hu-VEGF-165) donado por el Dr. Yancey Gillespie del Departamento de Neurocirugía de la Universidad de Alabama en Birmingham. Para la reacción de transcripción reversa se utilizó un microgramo de ARNm, y se realizó mediante un estuche comercial de RT-PCR siguiendo las indicaciones de la casa comercial (Applied Biosystems, Branchburg NJ). Se amplificaron las regiones variables de las cadenas pesadas y ligeras mediante el estuche comercial “*Mouse ScFv Module/Recombinant Phage Antibody System*” (Amersham Biosciences, Piscataway, NJ) de acuerdo con las indicaciones del fabricante. (Esquema I)



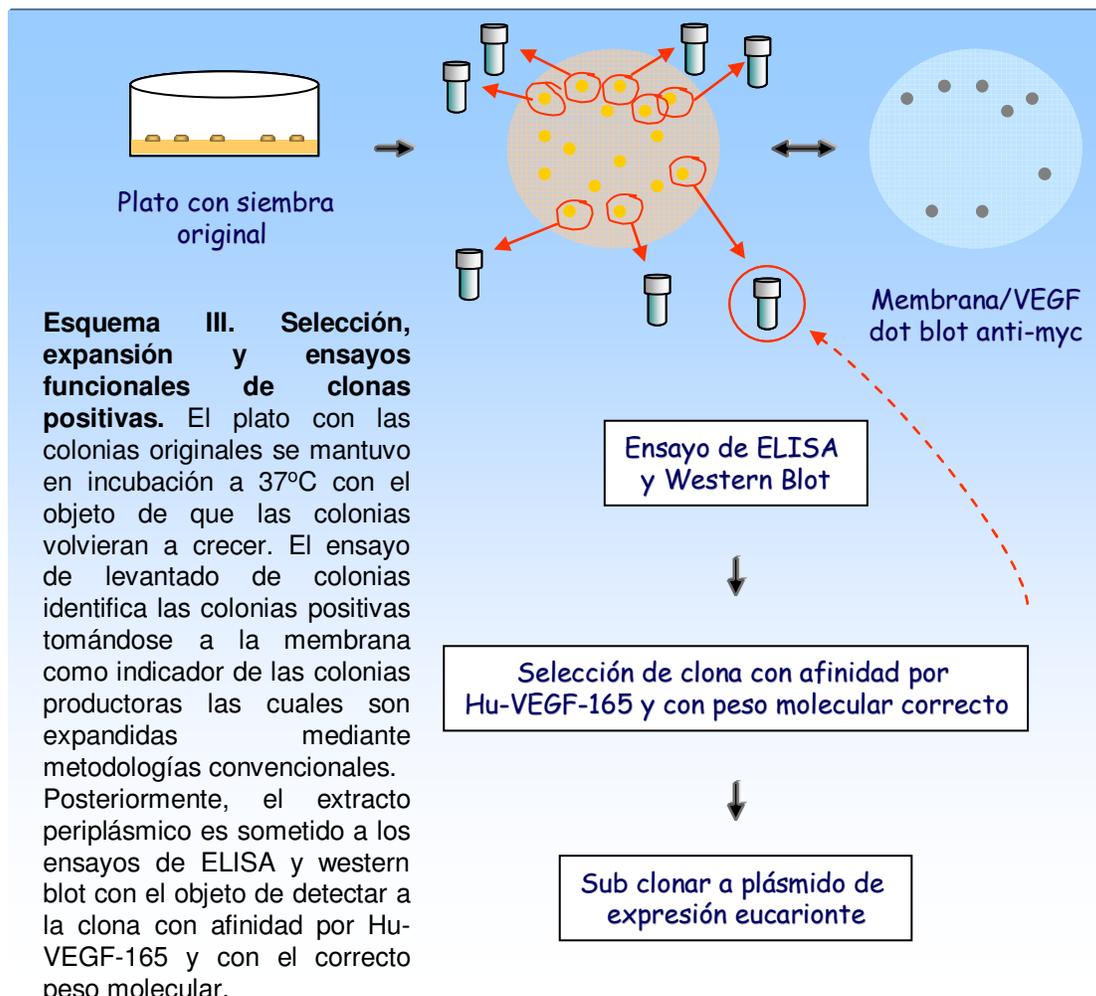
AFINIDAD POR VEGF-165 Y EXPRESIÓN EN CÉLULAS PROCARIONTAS: Una vez amplificadas las cadenas  $V_H$  y  $V_L$  se unieron al eslabón  $(Gly_4 Ser)_3$  mediante PCR. Una vez ensamblado, el anticuerpo se clonó en el plásmido pCANTAB 5, se transformaron bacterias HB2151 y se realizó el ensayo de levantado de colonias con el objeto de detectar colonias que expresaban scFvs con la capacidad de interactuar con VEGF-165. (Esquema II)



**Esquema II. Ensayo de levantado de colonias.** Una vez ensamblado, el anticuerpo de cadena sencilla fue clonado al fagémido pCANTAB y se realizó el ensayo de levantado de colonias para determinar las clonas que generan scFvs funcionales con afinidad por Hu-VEGF-165. El ensayo consistió en levantar las colonias sembradas en agar mediante una membrana saturada con Hu-VEGF-165, las colonias son inducidas a expresar el scFv mediante IPTG. Posteriormente se retiran las colonias de la membrana y esta es expuesta al Ab anti-myc marcado con HRP. Las colonias positivas son visualizadas en la membrana por la reacción de coloración de HRP. El plato con las colonias originales es mantenido en incubación a 37°C con el objeto de que las colonias originales vuelvan a crecer en su sitio original.

Se seleccionaron 20 colonias y se prepararon lisados para evaluar la afinidad por Hu-VEGF-165 mediante el ensayo de ELISA. Se documentó su expresión y correcto peso

molecular mediante el ensayo de *western blot*. Con la finalidad de demostrar los puntos anteriores, se fabricó una placa de 96 pozos (Amersham, Piscataway, NJ) con VEGF recombinante humano isoforma 165 (Invitrogen, Carlsbad, CA), a ésta se le adicionó el extracto celular en una solución de albúmina al 1% como bloqueador y se dejó incubar por toda la noche a 4°C. Posteriormente, se agregó un anticuerpo contra la etiqueta Myc (Invitrogen, Carlsbad, CA), marcado con peroxidasa de rábano (HRP) a una dilución 1:50. Paralelamente, se realizó un ensayo de *western blot* en las 20 colonias con el objeto de documentar su presencia y un peso molecular de 31 kDa. (Esquema III)



EXPRESIÓN DEL ANTICUERPO DE CADENCA SENCILLA (scFv) EN CÉLULAS EUCARIONTAS Y EFECTO INHIBIDOR SOBRE VEGF: Para determinar el efecto inhibitor del scFv sobre Hu-VEGF-165 en células eucariontas se subclonó al plásmido pSec-Tag-CANTAB-Friendly.KDEL cortando el inserto de 750 pbs con las enzimas Sfi-I y Not-I y se ligó con los sitios correspondientes del plásmido pSec-Tag-CANTAB-Friendly.KDEL con lo que se generó el plásmido pSec-Tag-CANTAB-Friendly.KDEL.Hu-VEGF-165.scFv. (Figura 17)

El plásmido pSec-Tag-CANTAB-Friendly.KDEL fue ensamblado en el Centro de Terapia Génica de la Universidad de Alabama en Birmingham con el objeto de generar un plásmido universal para el armado y caracterización de scFvs en marco de lectura compatible con el sistema “*Mouse ScFv Module/Recombinant Phage Antibody System*” de Amersham Biosciences. Se seleccionó el plásmido pSec-Tag debido a que la proteína en estudio es dirigida a la vía de secreción por el péptido señal (Igκ) en el extremo amino. Lo anterior sitúa en el retículo endoplásmico a VEGF y al scFv, propiciando su interacción. La secuencia HIS<sub>6</sub> del plásmido pSec-Tag se sustituyó por el polipéptido KDEL con función de retención en el retículo endoplásmico. La expresión del scFv en células eucariontas se corroboró mediante la técnica de *western blot*. Brevemente, 24 h previas a la lipofección, se sembraron 2x10<sup>5</sup> células T24 de cáncer de vejiga/pozo en platos de 6 pozos. El día de la lipofección se preparó el complejo lipofectamina/ADN de acuerdo con las indicaciones del fabricante. Posteriormente, se retiró el medio de cultivo y se agregó medio OPTIMEM sin suero fetal bovino, posteriormente, se agregó el complejo lipofectamina/plásmido y se incubó durante 3 h en condiciones convencionales de cultivo. Posteriormente, se agregó medio de cultivo completo y se dejó incubar 72 h. Transcurrido ese plazo, las células se sometieron a *western blot*

utilizando el anticuerpo marcado con HRP anti-myc (Invitrogen, Carlsbad, CA). El plásmido fue transfectado mediante lipofección a un panel de células neoplásicas (A673 (rabdomiosarcoma), D54 (glioblastoma), HeLa (cervico-uterino), EJ/T24 (vejiga), U251 (glioma) y WiTT (sarcoma), para determinar el efecto inhibitorio del scFv sobre Hu-VEGF-165. Como grupos controles, se estudiaron células transfectadas con plásmido irrelevante (pcDNA3) y no transfectadas (mock). Pasadas 72 h de la transfección génica, se recolectaron los sobrenadantes y se determinó la concentración del factor de crecimiento del endotelio vascular 165 en el medio de cultivo mediante el ensayo de ELISA (R&D Systems, Minneapolis, MN).

### **Generación de Adenovirus recombinante**

Tras la caracterización del scFv contra Hu-VEGF-165, se procedió a generar adenovirus recombinantes que codifican para dicha molécula. Para este fin, se subclonó mediante PCR el fragmento correspondiente al scFv al plásmido denominado pENTR. Posteriormente, éste fue subclonado al plásmido pAd/CMV/V5DEST. Una vez confirmada la presencia del inserto mediante PCR, el plásmido fue linearizado con la enzima Pac I y se transfectaron, mediante lipofectamina, células 293. Cuatro semanas posteriores a la lipofección se observó la formación de placas de lisis indicativas de la generación de adenovirus. Se recolectó el lisado total del cultivo y se sometió a PCR para evaluar la presencia del scFv.

Una vez que se confirmó la incorporación del scFv en el genoma adenoviral, se transdujeron células HeLa con el lisado crudo y se confirmó la expresión del scFv mediante *western blot* (resultados no mostrados).

## **Transducción *in vitro* de líneas celulares humanas, de ratón y de tejidos primarios de humano y de ratón**

Para la caracterización de las propiedades tróficas del adenovirus recombinante se utilizaron las líneas celulares humanas de cáncer de vejiga HT1197, HT1376 y T24 de la colección de tejido americana (ATCC-American Tissue Culture Collection, Manassas, VA). Las células se cultivaron en condiciones estándar de cultivo celular en DMEM/F12 suplementadas con 10% de suero fetal bovino, 2 mmol/L de glutamina, 100 U/mL de penicilina y estreptomicina y se conservaron en incubadoras de CO<sub>2</sub> al 5% a 37C°. La línea celular de cáncer de vejiga de ratón MBT-2 fue obtenida del Dr. Eli Gilboa de la Universidad Duke. La línea MBT-2 fue crecida en medio RPMI-1640, y se suplementó con 10% de suero fetal bovino, 2 mM L-glutamina, 1X de penicilina-estreptomicina y 0.25 g/mL de amphotericina B.

Para los experimentos de transducción de tejido primario humano, se utilizaron los cultivos de tejido genitourinario primario humano previamente establecidos en el Centro de Terapia Génica de la Universidad de Alabama en Birmingham. Los experimentos con tejido primario de ratón se realizaron con tejido normal de vejiga obtenido de ratones BALB/C (n = 3).

El tejido urotelial primario de ratón fue obtenido de la siguiente manera: se realizó dislocación cervical bajo anestesia general utilizando ketamina/xylazina 10 mg/1.5 mg/100 g. Posteriormente, se hizo una incisión en la línea media en la región supra púbica utilizando tijeras estériles y exponiendo los órganos abdominales. La vejiga se identificó y se extirpó quirúrgicamente. Las vejigas se colocaron en un plato petri estéril con PBS y fueron rebanadas en fragmentos de aproximadamente un milímetro. Se adicionó colágena tipo I de cola de rata y

solución de Ham suplementado con 1  $\mu\text{M}/\text{mL}$  de transferrina 10  $\mu\text{M}/\text{mL}$  de insulina, 1  $\mu\text{M}/\text{mL}$  de cortisona, 0.1 mM de aminoácidos no esenciales, 2 mM de L-glutamina, 2.7 mg/mL de dextrosa, 0.5 mM de etanolamina, 0.5  $\mu\text{M}$  de selenio, 1x de penicilina-estreptomina y 1% de suero fetal bovino. El medio fue cambiado cada 48 h y se mantuvieron en estas condiciones siete días antes de iniciar con los experimentos.

La transducción *in vitro* de las líneas celulares se llevó a cabo de la siguiente manera; 24 h previas a la transducción se plaquearon por triplicado  $1 \times 10^5$  células/pozo en platos de 6 pozos. El día de la transducción se extrajo el medio de cultivo, se agregó 1 mL de medio de cultivo correspondiente con 2% de suero fetal bovino, se administraron  $1 \times 10^4$  partículas virales/célula suspendidas en un volumen de 100  $\mu\text{L}$  y se incubaron 2 h en las mismas condiciones. Posteriormente se agregaron 2 mL de medio de cultivo correspondiente suplementado con 10% de suero fetal bovino y se mantuvieron estas condiciones hasta la determinación de actividad de luciferasa. Para la cuantificación de luciferasa, las células se lisaron en solución de lisis (Promega, Madison, WI), se cuantificaron las proteínas mediante la técnica de Bradford y se determinó la actividad de luciferasa con 5  $\mu\text{g}$  de proteína con el luminómetro Turner Designs DT-20/20 (Turner Designs Sunnyvale, CA).

### **Transducción de tejido GU *in vivo***

Los animales se mantuvieron en ciclos de 12 h día/noche, con una dieta basada en comida para roedores (Nutrition International., Brentwood, MO) y agua *ad libitum*. La transducción *in vivo* de tejido genito-urinario (GU) en ratón se llevó a cabo mediante la canulación intravesical y la infusión de adenovirus recombinantes bajo anestesia general inducida por inyección intra peritoneal de 10 mg + 1.5 mg/100 g de ketamina/xylazina. La cateterización vesical se realizó

utilizando un angiocath de teflón sin la guía de metal (24 GA/3/4 IN) (Becton, Dickinson, Sandy, Utah). Se infundió el grupo control (n = 3) con 150  $\mu$ L de medio de preservación viral (1 mM Tris, pH 8.0, 5 mM NaCl, 5% de albúmina bovina). Al grupo en estudio se le infundieron  $1 \times 10^{10}$  partículas formadoras de placas de Ad.CMV.Luc en un volumen total de 150  $\mu$ L de PBS. El cateter se mantuvo dentro de la vejiga 5 min después de la infusión de las soluciones correspondientes. Después de 24 h de la infusión adenoviral, se sacrificaron los ratones en una cámara de CO<sub>2</sub> y posteriormente se extrajeron las vejigas. Las vejigas fueron lisadas con el buffer de lisis del estuche comercial (Promega, Madison, WI), se cuantificaron las proteínas de cada una de las vejigas mediante la técnica de Bradford y se determinó la actividad de luciferasa con 5  $\mu$ g de proteína con el luminómetro Turner Designs DT-20/20 (Turner Designs Sunnyvale, CA). La transducción *in vivo* de tejido GU en rata se llevó a cabo mediante la canulación intravesical y la infusión de adenovirus recombinantes bajo anestesia general inducida mediante la inyección intra peritoneal de 10 mg + 1.5 mg/100 g de ketamina/xylazina. La cateterización vesical se realizó utilizando un angiocath previamente descrito. El grupo control (n = 3) fue infundido con 500  $\mu$ L de medio de preservación viral. El grupo en estudio fue infundido con  $1 \times 10^{10}$  partículas formadoras de placas de Ad.CMV. $\beta$ Gal en un volumen total de 500  $\mu$ L de PBS. El cateter se mantuvo dentro de la vejiga durante 60 min después de la infusión de las soluciones correspondientes. Las ratas fueron sacrificadas 48 h después de la infusión adenoviral y se extrajeron las vejigas. Posteriormente, se realizó el ensayo de X-gal para observar la expresión del gen reportero. Brevemente, las vejigas transducidas con Ad.CMV. $\beta$ Gal fueron rebanadas con una hoja de bisturí, se fijaron con formalina y se enjuagaron en PBS. Después se incubaron durante 24 h a 37°C en solución de

X-gal (10% DMF, 1.2 mM MgCl<sub>2</sub>, 3 mM K<sub>3</sub>FeCN y 3 mM de K<sub>4</sub>FeCN) en PBS. El tejido fue posteriormente teñido con hematoxilina y eosina para observar la morfología celular.

### **Adenovirus recombinantes**

Los adenovirus recombinantes con luciferasa (rAd-CMV-Luc) y con proteína verde fluorescente (GFP = *Green Fluorescent Protein*) (rAd-CMV-GFP) carecen de la región E1A/B y son incompetentes para replicarse. Fueron un obsequio del Dr. Robert Gerard de la Universidad de Texas Southwestern. El número de partículas virales infectivas fue determinado mediante ensayo de placa previamente descrito [219, 220].

### **Modelo intra arterial de terapia génica del cáncer**

Para la caracterización del modelo de terapia génica con acceso tumoral por vía arterial se utilizaron ratas macho atímicas homocigotas con un peso de 100-110 g obtenidas de Harlan Sprague Dawley Inc (Indianapolis, IN). Todos los animales se mantuvieron con ciclos de 12 h día/noche, con una dieta basada en comida para roedores (Nutrition International., Brentwood, MO) y agua *ad libitum*.

### **Inoculación tumoral en el músculo de cremaster**

La inoculación de la línea celular en el cremaster de las ratas se realizó bajo anestesia general inducida con una inyección de pentobarbital de sodio (50 mg/kg) (Abbott Laboratories, Chicago, IL). Se limpió el área quirúrgica con iodo y se realizó una incisión diagonal en la región inguinal siguiendo el trayecto del ligamento inguinal.

Después, el músculo cremaster derecho fue cuidadosamente disecado del escroto. Una vez disecado el cremaster, el testículo y el cordón espermático fueron liberados del interior del músculo a través de una incisión horizontal en la superficie anterior del tercio superior a nivel del anillo inguinal del cremaster y fueron guiados al interior de la cavidad abdominal. El tubo muscular se dejó invertido para la inoculación de las células tumorales.

Bajo observación microscópica (microscopio de disección Zeiss S3 OPMI Carl Zeiss, Gottingen Germany) se inocularon  $5 \times 10^4$  células T24 resuspendidas en 50  $\mu\text{L}$  de PBS mediante una jeringa de insulina (Becton & Dickinson Corp. Franklin, NJ). Se realizaron dos inoculaciones intramusculares de células tumorales, una a cada lado de las arterias y venas centrales del pedículo muscular. Una vez hecha a la inoculación, se regresó el tubo muscular a su posición anatómica normal dentro de la bolsa escrotal. La piel fue suturada con Vicryl de cinco ceros (Ethicon Inc. Somerville, NJ) y los animales fueron tratados con antibióticos (5,000 IU/kg de penicilina G) y con analgésicos (acetaminofen 110 mg/kg/PO).

Para realizar la curva de crecimiento se sacrificaron animales con una sobredosis de pentobarbital intraperitoneal a los días 10, 20 y 30 posteriores a la implantación. Se colectaron los tumores, se midieron y se tomaron fotografías representativas. Posteriormente, se fijaron en formol para incluirlos en parafina. Se hicieron cortes de 3  $\mu\text{m}$  y se tiñeron con hematoxilina-eosina para evaluación histopatológica.

### **Inoculación intra-arterial de adenovirus recombinantes**

La infusión intra-arterial de los vectores virales se realizó diez días después de la inoculación tumoral previamente descrita. Bajo condiciones de anestesia, las suturas de la anterior cirugía se removieron y el músculo cremaster se disecó y liberó de la bolsa escrotal. El cremaster y

la arteria pudo-epigástrica fueron disecados hasta su origen en los vasos iliacos. La arteria iliaca externa y la arteria femoral proximal fueron pinzadas con pinzas microquirúrgicas para aneurisma (Accurate Surgical & Scientific Instruments Corp., Westbury, NY). El pedículo muscular se purgó con 200  $\mu\text{L}$  de solución de PBS, mediante una jeringa de insulina. Posteriormente, se infundió  $1 \times 10^9$  de partículas formadoras de placas en un volumen total de 200  $\mu\text{L}$ .

### **Microscopia confocal**

Las masas tumorales que se crecieron en el cremaster se transdujeron vía intra-arterial utilizando el procedimiento anteriormente descrito. Se utilizaron  $1 \times 10^9$  pfus de Ad.CMV.GFP con un tiempo de pinzamiento de 1 h. Después de un periodo de 72 h a partir de la transducción adenoviral, las ratas fueron anestesiadas nuevamente con pentobarbital de sodio y se disecaron tanto el cremaster como los vasos iliacos y femorales. Con una jeringa de insulina se infundieron 200  $\mu\text{L}$  de microesferas con rojo Texas en solución, para marcar la vasculatura tanto del músculo como la del tumor. Hecho esto, se disecó el cremaster y se extirpó desde su origen. El tejido se fijó en una solución de formalina peso:volumen durante 1 h y fue montado en portaobjetos silanizados. Finalmente, se recolectaron imágenes de los tumores en microscopía en luz visible y en microscopia de fluorescencia confocal (Leica TCS-NT Microsystems AG, Germany).

### **Curva dosimétrica adenoviral**

Para realizar este experimento se utilizó Ad.CMV.Luc. Los animales fueron divididos en tres grupos e inoculados como se describió anteriormente con una dosis adenoviral de  $1 \times 10^8$  (n = 8),  $1 \times 10^9$  (n = 8) y  $1 \times 10^{10}$  (n = 8) partículas formadoras de placas. A las 72 h horas de la

infusión adenoviral se sacrificó con una sobredosis de pentobarbital. Los tumores fueron recolectados y se lisaron con el buffer de lisis del estuche comercial (Promega, Madison, WI) para obtener la proteína total. Se cuantificaron las proteínas de cada una de los tumores mediante la técnica de Bradford. Posteriormente, se determinó la actividad de luciferasa con 5  $\mu$ g de proteína con el luminómetro Turner Designs DT-20/20 (Turner Designs, Sunnyvale, CA). Los controles negativos consistieron en animales que fueron inoculados con PBS y en aquéllos operados pero sin inoculación.

### **Efecto del tiempo de incubación adenoviral sobre la transducción tumoral**

Para realizar este experimento se utilizó AdCMV-Luc. Los animales fueron divididos en tres grupos: en el Grupo 1 (n = 8) el pinzamiento de la arteria se mantuvo por 5 min; en el Grupo 2 (n = 8) el pinzamiento fue de 30 min, y en el Grupo 3 (n = 8) fue de 1 h. Transcurridos dichos tiempos, se liberó el flujo para restablecer la circulación arterial y se prosiguió con la cirugía ya mencionada. Transcurridas 72 h de la cirugía, se sacrificó a los animales con una sobredosis de pentobarbital; se recolectaron los tumores y se lisaron con una solución amortiguadora de lisis del estuche comercial (Promega) para obtener la proteína total. Después se cuantificaron las proteínas de cada una de las ratas mediante la técnica de Bradford y se determinó la actividad de luciferasa con 5  $\mu$ g de proteína con el luminómetro Turner Designs DT-20/20 (Turner Designs Sunnyvale, CA). Los controles negativos consistieron en animales inoculados con PBS y en los operados pero sin inoculación.

## RESULTADOS

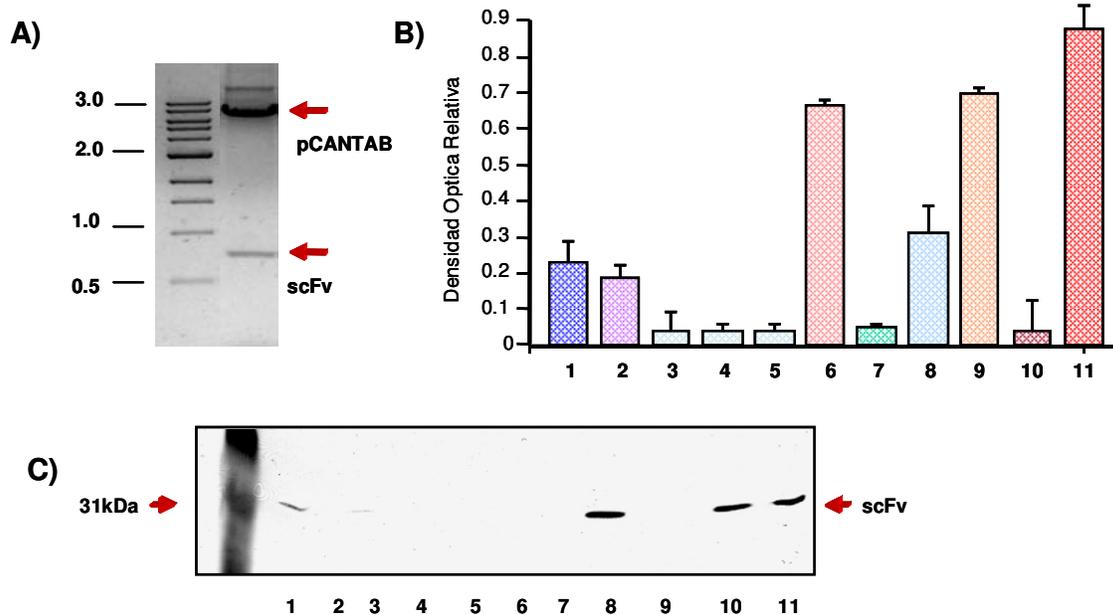
### ENSAMBLAJE, CARACTERIZACIÓN Y EFECTO MODULADOR DE UN ANTICUERPO INTRACELULAR DE CADENA SENCILLA DIRIGIDO AL FACTOR DE CRECIMIENTO DEL ENDOTELIO VASCULAR HUMANO ISOFORMA 165 (Hu-VEGF-165)

Se ha establecido que el crecimiento tumoral es angiodependiente. El proceso angiogénico implica la pérdida del equilibrio local entre factores pro-angiogénicos y factores anti-angiogénicos. La pérdida del balance local depende, en gran medida, de la secreción excesiva de factores pro-angiogénicos por parte de la masa tumoral.

Hasta la fecha, las evidencias tanto experimentales como clínicas indican que los VEGFs son centrales en la iniciación y mantenimiento de la respuesta angiogénica. Por lo anterior, nos propusimos construir un anticuerpo de cadena sencilla que al ser expresado intracelularmente interactuara con el factor de crecimiento del endotelio vascular humano isoforma 165 (Hu-VEGF-165) e inhibiera su secreción. Con este fin, se obtuvo ARNm de un hibridoma que secreta un anticuerpo monoclonal que reconoce la versión dimérica biofuncional del Hu-VEGF-165 y se generó una biblioteca de cADN mediante RT. Posteriormente, se amplificaron las regiones variables de las cadenas pesadas ( $V_H$ ) y ligeras ( $V_L$ ) del anticuerpo y se unieron al eslabón  $(Gly_4 Ser)_3$  mediante PCR.

Una vez ensamblado, el anticuerpo de cadena sencilla se clonó dentro del plásmido pCANTAB y se realizó el ensayo de levantamiento de placa para determinar las clonas que generan scFvs funcionales con afinidad por Hu-VEGF-165. Se cosecharon 20 colonias y

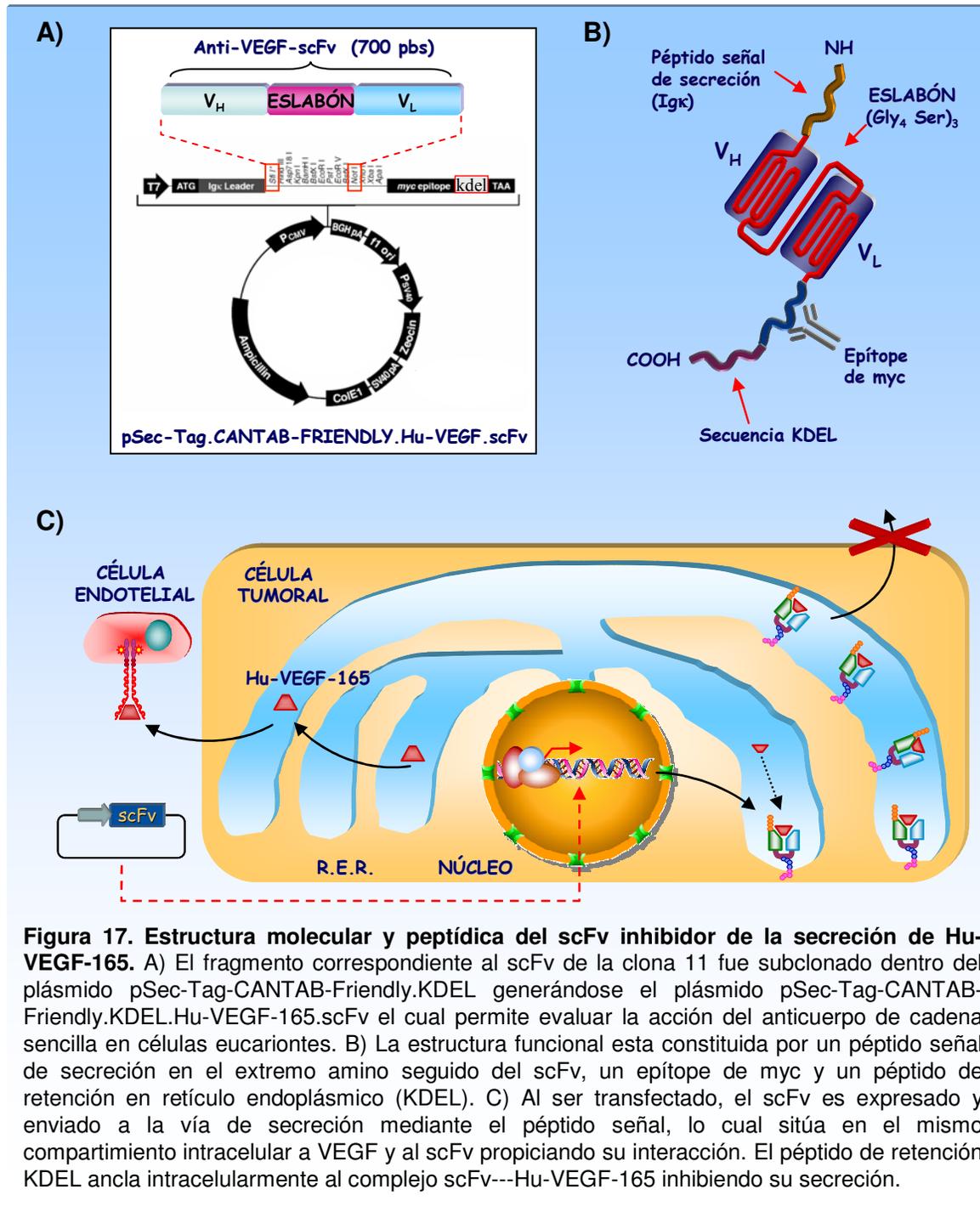
mediante el ensayo de ELISA y de *western blot* se determinó que la clona 11 presentó afinidad por Hu-VEGF-165 y expresó el peso correcto del anticuerpo de cadena sencilla (scFv). (Figura 16).



**Figura 16. Caracterización de un anticuerpo intracelular de cadena sencilla dirigido al factor vascular de crecimiento endotelial humano isoforma 165 (Hu-VEGF-165).** A) clonación de la biblioteca de scFv's en el plásmido pCANTAB, el plásmido fue digerido con las enzimas de restricción Sfi I y Not I las cuales liberan el scFv de 700 pbs. B) Ensayo de afinidad por VEGF en platos de ELISA cubiertos de VEGF, clonas enumeradas del 1 – 11 fueron obtenidas por medio del ensayo del levantamiento de placa como se describe en materiales y métodos, las barras representan la media  $\pm$  la desviación estándar (n=3). C) Ensayo de western blot, la clona 11 expresa el anticuerpo intracelular con mayor eficiencia y concuerda con afinidad por Hu-VEGF-165.

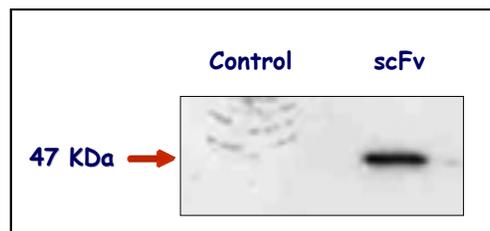
El fragmento correspondiente al scFv de la clona 11 fue subclonado dentro del plásmido pSec-Tag-CANTAB-Friendly.KDEL con lo cual se generó el plásmido pSec-Tag-CANTAB-Friendly.KDEL.Hu-VEGF-165.scFv, el cual permite evaluar la acción del anticuerpo de cadena sencilla en células eucariontas. Se seleccionó el plásmido pSec-Tag ya que la proteína de interés es dirigida a la vía de secreción por el péptido señal “Igκ” en el extremo amino. Lo anterior propicia la interacción entre VEGF y el scFv porque los sitúa en el mismo compartimiento intracelular (retículo endoplásmico). Adicionalmente, la secuencia

HIS<sub>6</sub> del plásmido pSec-Tag se substituyó por el polipéptido KDEL con función de retención en el retículo endoplásmico (Figura 17).



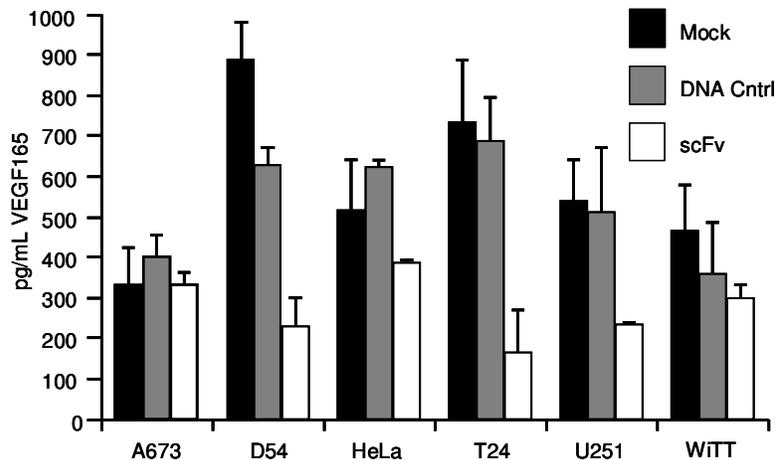
**Figura 17. Estructura molecular y peptídica del scFv inhibidor de la secreción de Hu-VEGF-165.** A) El fragmento correspondiente al scFv de la clona 11 fue subclonado dentro del plásmido pSec-Tag-CANTAB-Friendly.KDEL generándose el plásmido pSec-Tag-CANTAB-Friendly.KDEL.Hu-VEGF-165.scFv el cual permite evaluar la acción del anticuerpo de cadena sencilla en células eucariontes. B) La estructura funcional esta constituida por un péptido señal de secreción en el extremo amino seguido del scFv, un epítotope de myc y un péptido de retención en retículo endoplásmico (KDEL). C) Al ser transfectado, el scFv es expresado y enviado a la vía de secreción mediante el péptido señal, lo cual sitúa en el mismo compartimiento intracelular a VEGF y al scFv propiciando su interacción. El péptido de retención KDEL ancla intracelularmente al complejo scFv---Hu-VEGF-165 inhibiendo su secreción.

El plásmido pSec-Tag-CANTAB-Friendly.KDEL.Hu-VEGF-165.scFv se lipofectó en células T-24 de cáncer de vejiga con el propósito de corroborar su expresión y correcto peso molecular. A las 72 h después de la lipofección se realizó el ensayo de *western blot*. Como se observa en la figura 18, el scFv es expresado en células eucariontes y tiene el peso molecular correcto de 47 kDa de acuerdo con un marcador de peso molecular convencional.



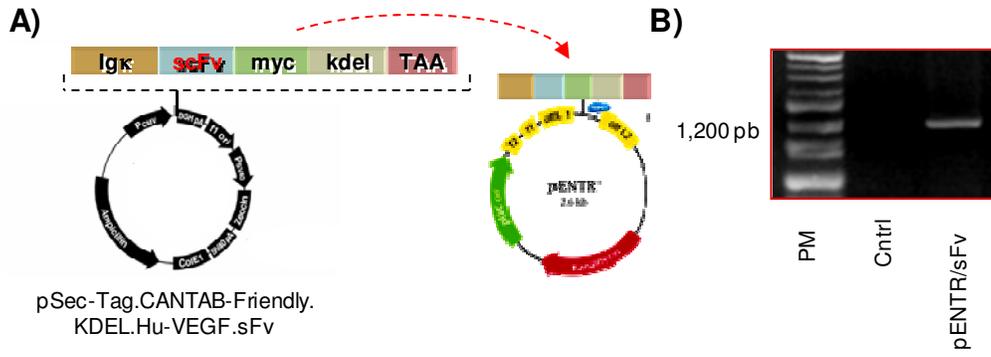
**Figura 18. Expresión del scFv en la línea de cáncer de vejiga humana T-24 .** La expresión del Hu-VEGF-165.scFv en células eucariontas se corroboró mediante la técnica de western blot. Veinticuatro horas previas a la lipofección, se sembraron  $2 \times 10^5$  células T-24 de cáncer de vejiga/pozo en platos de 6 pozos. Se preparó el complejo lipofectamina/DNA de acuerdo a las indicaciones del proveedor. Setenta y dos horas posteriores a la lipofección las células se sometieron al ensayo de western blot utilizando el anticuerpo anti-myc marcado con la enzima HRP. El grupo control consta de células T-24 no transfectadas.

Para determinar el efecto inhibitorio del scFv sobre la secreción Hu-VEGF-165, el plásmido fue transfectado a un panel de células neoplásicas (A673 (rabdiosarcoma), D54 (glioblastoma), HeLa (cervico-uterino), T24 (vejiga), U251 (glioma) y WiTT (sarcoma). A las 72 h posteriores a la lipofección, con el ensayo de ELISA, se cuantificó la cantidad de Hu-VEGF-165 en el medio condicionado. Como grupos de control se estudiaron células transfectadas con un plásmido irrelevante (pcDNA3), y no transfectadas (mock). Como se aprecia en la figura 19, se observó una reducción en los niveles de secreción de Hu-VEGF-165 en las líneas estudiadas con excepción de la línea A673 de rabdiosarcoma (Figura 19).

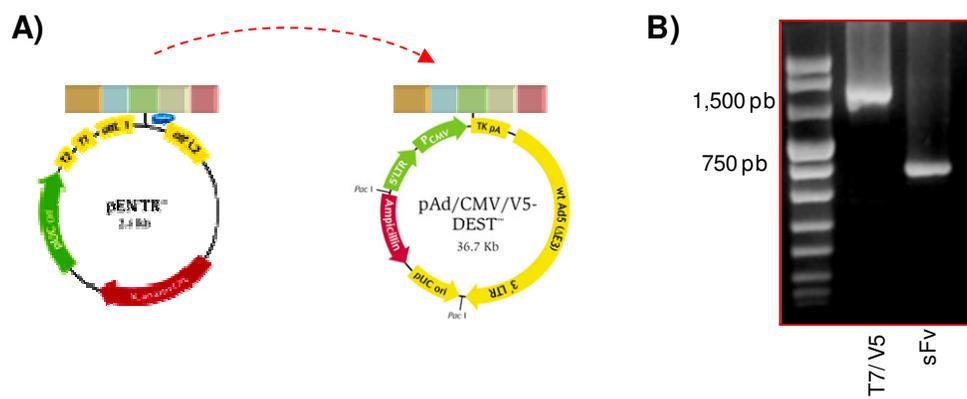


**Figura 19. El scFv inhibe la secreción de VEGF-165 humano en un panel de células neoplásicas.** El plásmido pSec-Tag-CANTAB-Friendly.KDEL.Hu-VEGF-165.scFv fue lipofectado a un panel de células neoplásicas (A673 (rabdiosarcoma), D54 (glioblastoma), HeLa (cervico-uterino), EJ/T24 (vejiga), U251 (glioma) y WiTT (sarcoma). Utilizando un ensayo de ELISA se determinó la cantidad de Hu-VEGF-165 en el medio condicionado. Como grupos control se estudiaron células transfectadas con un plásmido irrelevante (pcDNA3) y células no transfectadas (mock). Las barras representan la media  $\pm$  la desviación estándar (n = 3).

Una vez armado y caracterizado el scFv contra Hu-VEGF-165, se procedió a generar un adenovirus recombinante codificante para dicha molécula. Para este fin, mediante PCR se clonó el fragmento correspondiente al scFv al plásmido denominado pENTR, (Figura 20), posteriormente, éste fue subclonado dentro del plásmido pAd/CMV/V5DEST generando el plásmido pAd/CMV/V5DEST.Hu-VEGF-165-scFv (Figura 21).

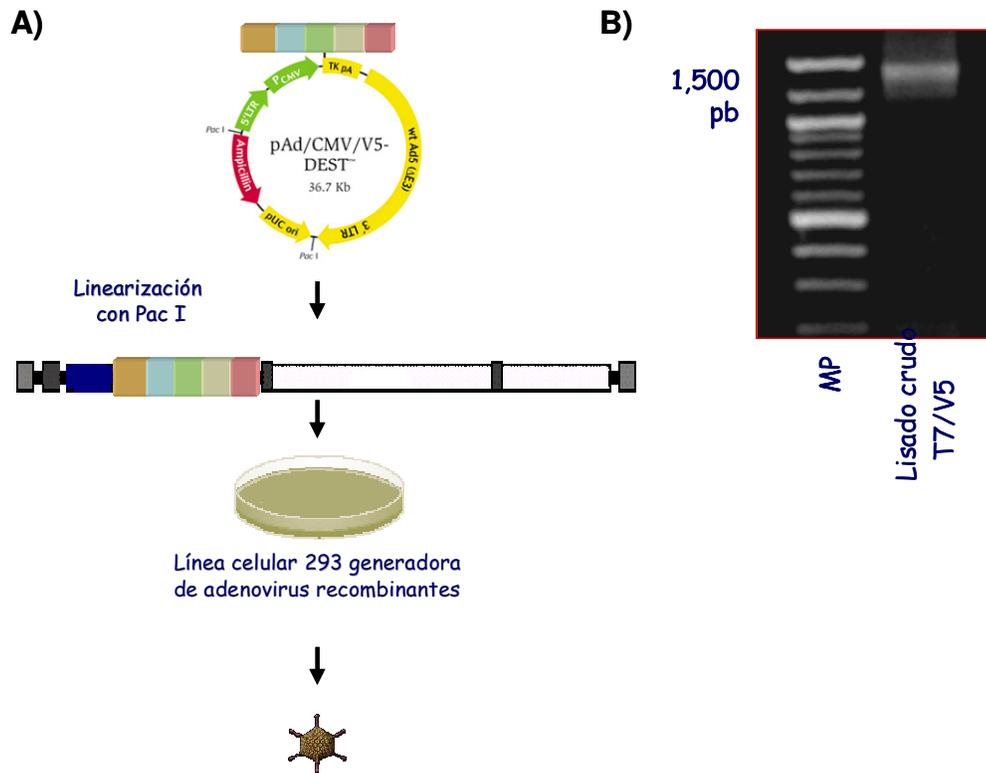


**Figura 20. Generación de un adenovirus recombinante codificante para el Hu-VEGF-165.scFv.** A) Una vez armado y caracterizado el scFv contra Hu-VEGF-165 se generó un adenovirus recombinante codificante para dicha molécula. Mediante PCR se clonó el fragmento correspondiente al scFv al plásmido denominado pENTR. B) La presencia del scFv en el plásmido pENTR fue corroborado mediante PCR.



**Figura 21. Generación de un adenovirus recombinante codificante para el Hu-VEGF-165.scFv.** A) Una vez que el fragmento correspondiente al scFv fue clonado al plásmido pENTR, este fue subclonado al plásmido pAd/CMV/V5DEST. B) La presencia del scFv en el plásmido pAd/CMV/V5DEST fue corroborado mediante PCR.

Tras confirmar la presencia del inserto mediante PCR, se linearizó el plásmido con la enzima Pac I y se lipofectaron células 293. Cuatro semanas después de la lipofección se observó la formación de placas indicativas de la generación de adenovirus. Se recolectó el lisado total de dicho cultivo y se sometió a PCR para evaluar la presencia del scFv. Como se observa en la figura 22, la reacción de PCR indica la presencia del scFv en el genoma del adenovirus recombinante.

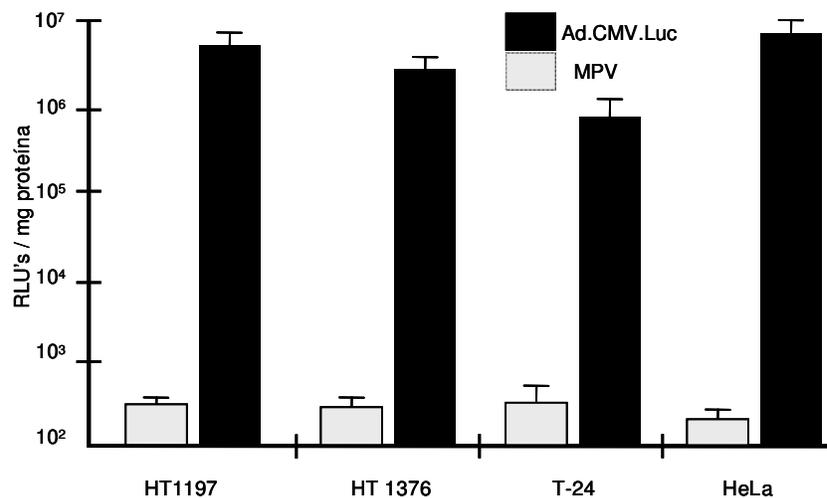


**Figura 22. Generación de un adenovirus recombinante codificante para el Hu-VEGF-165.scFv.** Una vez confirmada la presencia del inserto mediante PCR el plásmido fue linearizado con la enzima Pac I y se lipofectó a células 293 (A). Cuatro semanas posteriores a la lipofección se observó la formación de placas indicativas de la generación de adenovirus. Se recolectó el lisado total y se sometió a PCR para evaluar la presencia del scFv (B).

Una vez generado el adenovirus recombinante codificante para el scFv anti Hu-VEGF-165, se consideró que para que este logre un efecto anti-angiogénico y anti-tumoral efectivo se requeriría de una transducción tumoral eficiente. Por lo anterior, se procedió a estudiar los perfiles de transducción adenoviral en diversas líneas tumorales y primarias provenientes del epitelio de vejiga *in vitro* e *in vivo*. Adicionalmente, se estudiaron los perfiles de transducción adenoviral en un nuevo modelo de transducción tumoral vía intra–arterial.

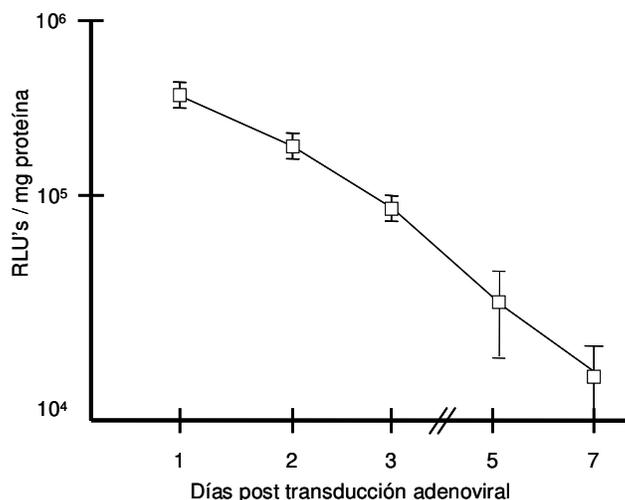
## TRANSDUCIBILIDAD ADENOVIRAL AL UROTELIO HUMANO Y MURINO

El éxito terapéutico de las metodologías de transgénesis depende y dependerá de la entrega eficiente del gen terapéutico al sitio del crecimiento tumoral. Para determinar el potencial terapéutico del Hu-VEGF-165.scFv mediante adenovirus recombinantes se estudió la transducibilidad adenoviral en tres líneas celulares de cáncer de vejiga de procedencia humana. Se utilizó la línea celular de carcinoma cérvico-uterino (HeLa) como control positivo, ya que se ha establecido que esta línea celular es transducida eficientemente con



**Figura 23. Adenovirus recombinantes transducen eficientemente líneas celulares de urotelio humano.** Se estudió la transducibilidad adenoviral en tres líneas celulares de cáncer de vejiga humana con el objeto de determinar su potencial como transportadores del Hu-VEGF-scFv. Veinticuatro horas previas a la transducción adenoviral con el Adenovirus recombinante codificante para el gen reportero de luciferasa (Ad.CMV.Luc), las células HT1197, HT1376 y T-24 fueron sembradas por triplicado (MOI de  $1 \times 10^5$  células/pozo) en platos de 6 pozos. Se utilizó la línea celular de cáncer cervico uterino "HeLa" como control positivo. El día de la transducción se extrajo el medio de cultivo, se agregó 1 mL de medio de cultivo con 2 % de suero fetal bovino. Se administraron  $1 \times 10^4$  partículas virales infectivas/célula y se incubaron 2 h. Posteriormente se agregaron 2 mL de medio de cultivo con 10% de suero fetal bovino y se mantuvieron en estas condiciones hasta la determinación de actividad de luciferasa 48 h posteriores a la transducción adenoviral. El grupo control constó de células tratadas con medio de preservación viral (MPV). Las barras representan la media  $\pm$  la desviación estándar (n = 3). RLU = "Relative Light Units" unidades relativas de luz. MOI = "Multiplicity of Infection" Multiplicidad de la infección: relación entre la cantidad de partículas infectivas virales y la cantidad de blanco infectivo, en este caso células.

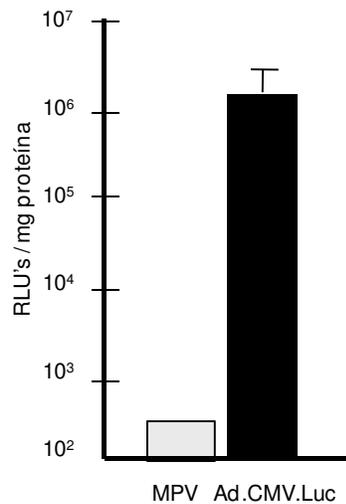
adenovirus recombinantes. Como se observa en la figura 23, las líneas celulares humanas HT1197, HT1376 y T24 mostraron niveles de actividad de luciferasa similares a los expresados por la línea celular HeLa.



**Figura 24. Patrón temporal de expresión génica en la línea celular de cáncer de vejiga humana T-24.** La línea celular humana de cáncer de vejiga T-24 fue transducida con  $1 \times 10^4$  partículas virales infectivas/célula de Ad.CMV.Luc. La actividad de dicha enzima se cuantificó a los días 1, 2, 3, 5 y 7 posteriores a la transducción. Los puntos graficados representan la media  $\pm$  la desviación estándar ( $n = 3$ ). RLU's = "Relative Light Units" unidades relativas de luz.

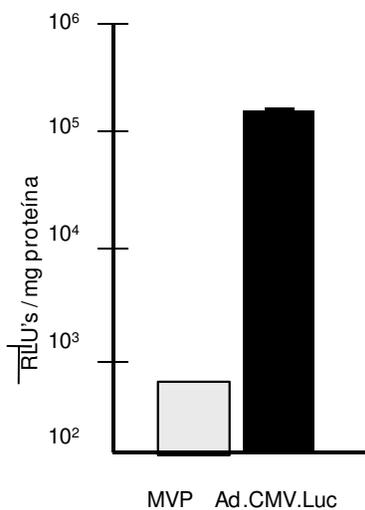
Una vez establecido que los adenovirus recombinantes transducen eficientemente líneas celulares de cáncer de vejiga humana, se determinó el patrón temporal de expresión del gen reportero luciferasa (Figura 24). En dicho experimento, la línea celular T-24 se transdujo con el adenovirus recombinante codificante para la enzima luciferasa y se cuantificó la actividad de dicha enzima en el primero, segundo, tercero, quinto y séptimo días después de la transducción. Los resultados demuestran que la enzima reportera mostró una actividad máxima a las 24 h post transducción, y disminuyó en los días subsecuentes, observándose actividad enzimática aún al séptimo día post transducción adenoviral. (Figura 24)

Una vez establecida la capacidad adenoviral de transducir líneas celulares de cáncer de vejiga humana se prosiguió a la demostración de esta capacidad de transducción en tejido urotelial primario humano no neoplásico. Para conseguir este objetivo, se obtuvieron muestras quirúrgicas de vejiga humana no maligna y se transdujeron con el adenovirus codificante para luciferasa. Los resultados presentados en la figura 25 indican que el urotelio humano no transformado es susceptible de transducción mediada por adenovirus recombinantes.



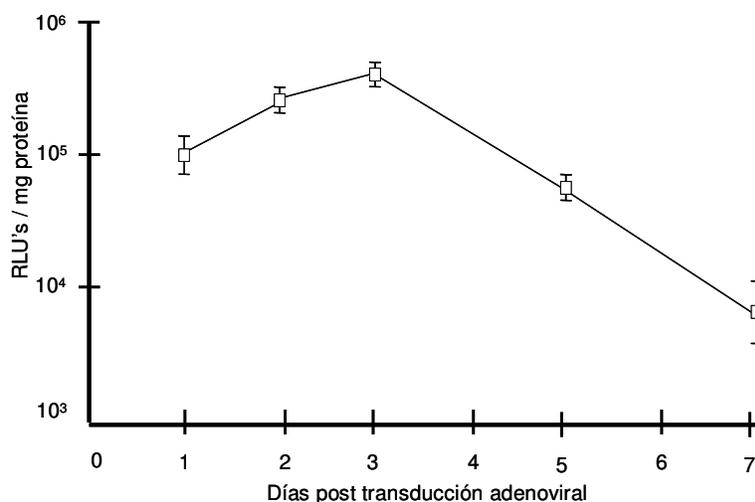
**Figura 25. Adenovirus recombinantes transducen eficientemente tejido genitu-urinario humano primario no neoplásico.** Adicionalmente se estudió la transducibilidad adenoviral en tejido urotelial primario humano no neoplásico. Se obtuvieron muestras quirúrgicas de vejiga humana no maligna y se cultivaron como se describe en materiales y métodos. Se transdujeron con  $1 \times 10^4$ /célula de Ad.CMV.Luc. El grupo control consistió de células tratadas con medio de preservación viral (MPV). Las barras representan la media  $\pm$  la desviación estándar ( $n = 3$ ). RLU's = "Relative Light Units" unidades relativas de luz.

Una vez determinado que los adenovirus recombinantes pueden ser de utilidad como vectores acarreadores de genes terapéuticos en el tratamiento de cáncer de vejiga, consideramos los diferentes modelos animales donde podrían experimentarse dichas propuestas de terapia génica y se seleccionó a la línea celular de cáncer de vejiga de ratón MBT-2 para estudios de transducibilidad adenoviral *in vitro*. Los resultados presentados en la figura 26 sugieren que la línea MBT-2 puede ser transducida por adenovirus recombinantes.



**Figura 26. Adenovirus recombinantes transducen eficientemente la línea celular de cáncer de vejiga de ratón MBT-2.** Con el objeto de estudiar diversas estrategias de terapia génica anti-neoplásica en modelos en ratón de cáncer de vejiga se seleccionó la línea celular de cáncer de vejiga (MBT-2).  $2 \times 10^5$  células MBT-2 se transdujeron con  $1 \times 10^4$ /célula de Ad.CMV.Luc. El ensayo de luciferasa se realizó 48 h posteriores a la transducción adenoviral. El grupo control consistió de células tratadas con medio de preservación viral (MPV). Las barras representan la media  $\pm$  la desviación estándar ( $n = 3$ ). RLU's = "Relative Light Units" unidades relativas de luz.

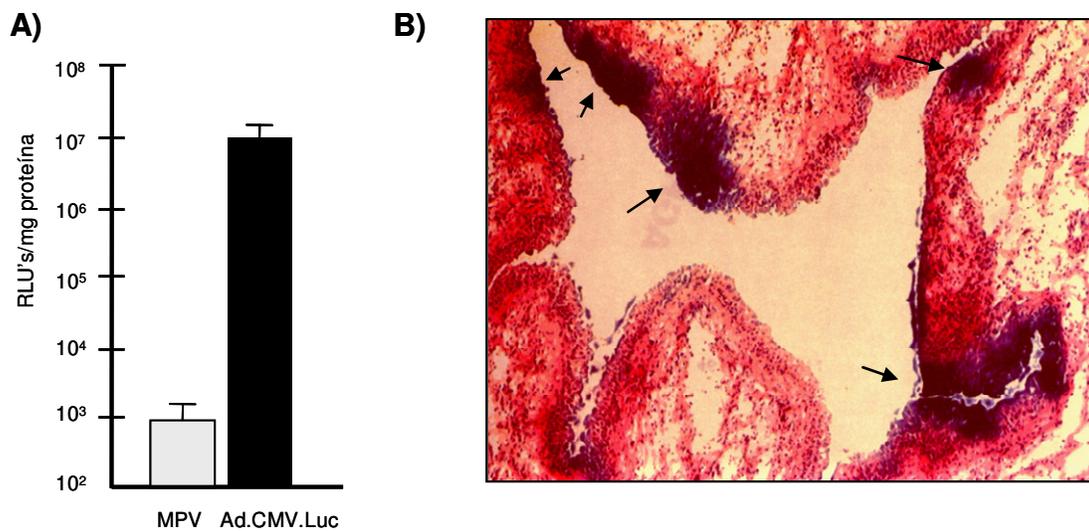
Posteriormente, se determinó el patrón temporal de expresión génica en la línea celular MBT-2. Los resultados presentados en la figura 27 muestran un patrón de expresión génica similar a la línea celular humana, se observó una máxima expresión a las 72 h post-transducción y un decremento progresivo a lo largo de los días subsecuentes.



**Figura 27. Patrón temporal de expresión génica en la línea de cáncer de vejiga de ratón MBT-2.** La línea celular de cáncer de vejiga de ratón MBT-2 fue transducida con  $1 \times 10^4$  partículas infecciosas/célula de Ad.CMV.Luc. La actividad de luciferasa se cuantificó a los días 1, 2, 3, 5 y 7 post transducción adenoviral. Los puntos graficados representan la media  $\pm$  la desviación estándar (n=3). RLU's = "Relative Light Units" unidades relativas de luz.

Después, se estudió la posibilidad de transducción adenoviral *in vivo*. Para este fin se canuló vesicalmente a ratones Balb/C bajo anestesia general y se infundieron adenovirus codificantes para el gen de la enzima luciferasa. Transcurridas 72 h de la infusión adenoviral se recolectaron las vesículas y se determinó su actividad enzimática. Los resultados presentados en la figura 28 indican que el urotelio vesical es transducible por vía transuretral mediante adenovirus recombinantes. Hecho lo anterior, se estudió la posibilidad de transducción adenoviral *in vivo* en rata. Para este fin se canuló vesicalmente a ratas Sprague-

Dawley bajo anestesia general y se infundieron adenovirus codificantes para el gen de la enzima reportera  $\beta$ -Galactocidasa; después de 72 h de la infusión adenoviral se recolectaron las vejigas y se determinó la presencia de actividad enzimática mediante el ensayo de X-gal. Los resultados presentados en la figura 28 indican que el urotelio vesical de rata es transducible por vía transuretral mediante adenovirus recombinantes.



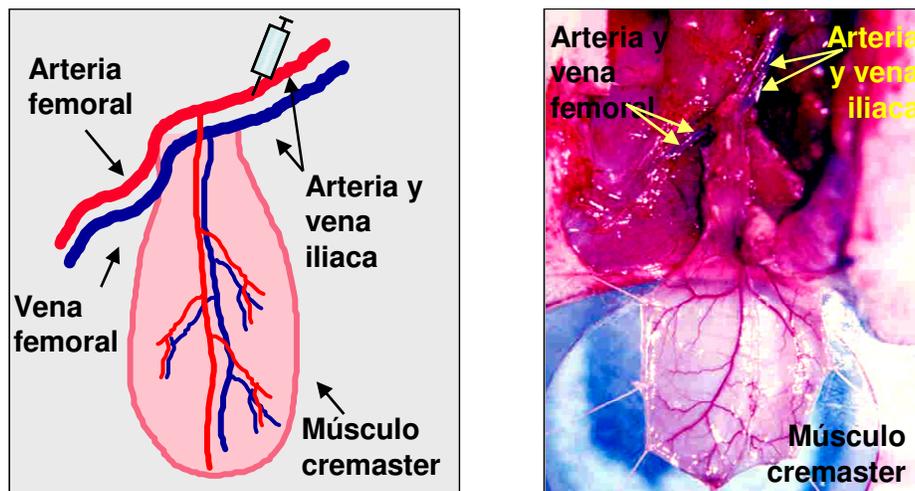
**Figura 28. Adenovirus recombinantes transducen eficientemente urotelio murino *in vivo*.**

A) Actividad de la enzima reportera luciferasa en tejido vesical transducido *in vivo* mediante adenovirus recombinantes. La transducción *in vivo* de tejido genito urinario (GU) en ratón se llevó a cabo mediante la canulación intravesical y la infusión de adenovirus recombinantes bajo anestesia general. El grupo control ( $n = 3$ ) fue infundido con 150  $\mu$ L de medio de preservación viral (MPV). El grupo en estudio ( $n = 3$ ) fue infundido con  $1 \times 10^{10}$  partículas formadoras de placas de Ad.CMV.Luc en un volumen total de 150  $\mu$ L de PBS. El cateter se mantuvo dentro de la vejiga 5 min después de la infusión de las soluciones correspondientes. Veinticuatro horas posteriores a la infusión adenoviral los ratones fueron sacrificados, se extrajeron las vejigas y se determinó la actividad de luciferasa. Las barras representan la media  $\pm$  la desviación estándar ( $n = 3$ ). B) Actividad de la enzima reportera  $\beta$ -Galactocidasa en tejido vesical transducido mediante adenovirus recombinantes *in vivo*. La transducción *in vivo* se llevó a cabo como descrito anteriormente. El grupo control ( $n = 3$ ) fue infundido con 500  $\mu$ L de medio de preservación viral. El grupo en estudio ( $n = 3$ ) fue infundido con  $1 \times 10^{10}$  partículas formadoras de placas en un volumen total de 500  $\mu$ L de PBS de adenovirus codificante para la enzima reportera  $\beta$ -Galactocidasa (Ad.CMV. $\beta$ -Gal). El cateter se mantuvo dentro de la vejiga durante 60 min después de la infusión de las soluciones correspondientes. Cuarenta y ocho horas posteriores a la infusión adenoviral las ratas fueron sacrificadas, se extrajeron las vejigas y se realizó el ensayo de X-Gal. El tejido fue posteriormente teñido con hematoxilina y eosina para observar la morfología celular. Las flechas señalan los sitios de expresión de la enzima reportera  $\beta$ -Galactocidasa.

## Transducción tumoral adenoviral por vía intra arterial

La eficacia terapéutica de las estrategias de transgénesis depende de obtener perfiles elevados de transducción tumoral. Estudios de transducción tumoral por vía intra arterial en humanos y en modelos animales han comprobado su viabilidad. Sin embargo, no existe un modelo que permita la evaluación sistemática de las variables que afectan la transducción tumoral por esta vía.

En este sentido, el músculo cremaster de la rata se ha utilizado extensamente para el estudio de la dinámica intra tumoral, las propiedades estructurales de los vasos sanguíneos tumorales y las propiedades de la microcirculación en diversos estados fisiopatológicos [221, 222]. El músculo cremaster de la rata tiene, además, propiedades atractivas para el crecimiento de masas tumorales y para el estudio sistemático de las variables que afectan la transducción adenoviral tumoral por vía arterial.



**Figura 29. Anatomía y propiedades del músculo cremaster de la rata.** El músculo cremaster de la rata es un sitio atractivo para el estudio de las variables que afectan la transducción tumoral por vía intra-arterial. 1) Las arteria iliaca y la vena femoral son manipulables microquirúrgicamente. Esto hace posible el acceso intra-arterial al pedículo muscular y al sitio de crecimiento tumoral y controlar los tiempos de flujo arterial y venoso mediante la aplicación de “clamps” microvasculares. 2) El músculo cremaster está constituido por músculo esquelético vascularizado óptimo para el implante y crecimiento de masas tumorales. 3) La forma tubular del músculo cremaster permite el crecimiento de la masa tumoral en un entorno protegido, manteniendo sin daño la estructura tumoral y vascular para estudios subsecuentes.

Primero, la anatomía vascular del músculo cremaster permite que las arterias iliaca y femoral puedan ser manipuladas mediante técnicas de microcirugía convencionales, esto hace viable el acceso intra arterial al parénquima muscular y al sitio de crecimiento tumoral, con lo que se pueden controlar los tiempos de flujo arterial y venoso. (Figura 29)

Segundo, el músculo cremaster de la rata está constituido por músculo esquelético vascularizado, el cual es el substrato adecuado para el implante y crecimiento de masas tumorales.

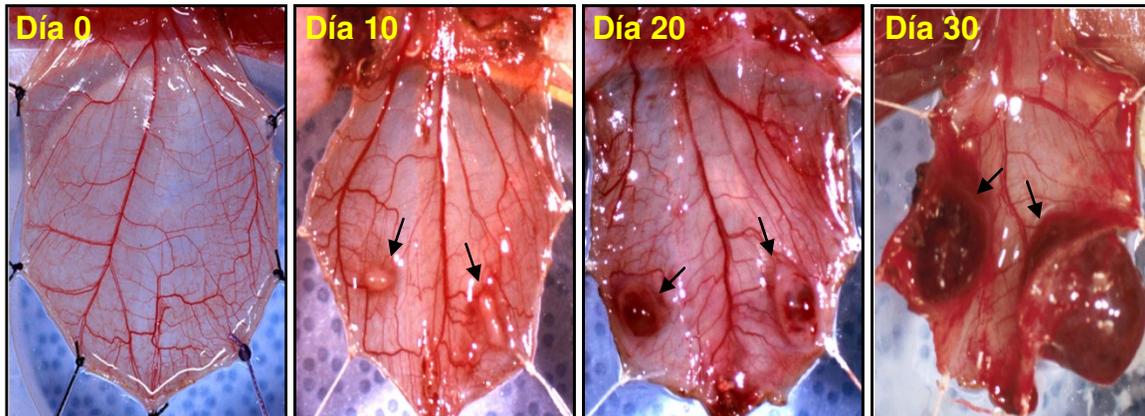
Tercero, el músculo cremaster de la rata tiene una forma tubular en donde la masa tumoral crece en un entorno protegido, lo que protege la estructura tumoral y vascular al disecarla quirúrgicamente. Esto es de relevancia para estudios posteriores si se desea conservar la estructura del tumor sin daños.

Cuarto, la neoangiogénesis que estimula el tumor se desarrolla en el contexto de la vasculatura “normal”, lo cual posibilita documentar una toxicidad diferencial, en el caso de estrategias donde se pretende dirigir la toxicidad solamente a los vasos sanguíneos tumorales. Por estas razones estudiamos el potencial del músculo cremaster de la rata como un nuevo modelo de transgénesis terapéutica del cáncer con el cual se tiene un acceso a la masa tumoral por vía intra arterial.

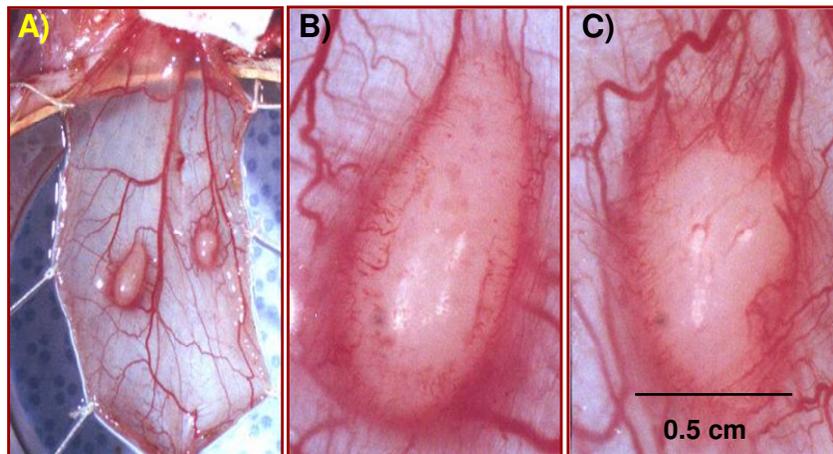
### **Crecimiento tumoral en el cremaster de ratas desnudas**

Inicialmente se determinó la posibilidad de crecer tumores de células de cáncer de vejiga humana (T-24) implantadas en el músculo cremaster de ratas desnudas. Con este fin se infiltraron  $5 \times 10^4$  células T24 en el músculo y se analizó el crecimiento tumoral a los 10, 20 y

30 días posteriores a la infiltración. Como se observa en la figura 30, se documentó el desarrollo de masas tumorales con diámetros superiores a los 5 mm en el transcurso de los tiempos estudiados. Adicionalmente, se observó el desarrollo de vasos sanguíneos concéntricos que penetran la masa tumoral, así como edema peritumoral. (Figura 31)



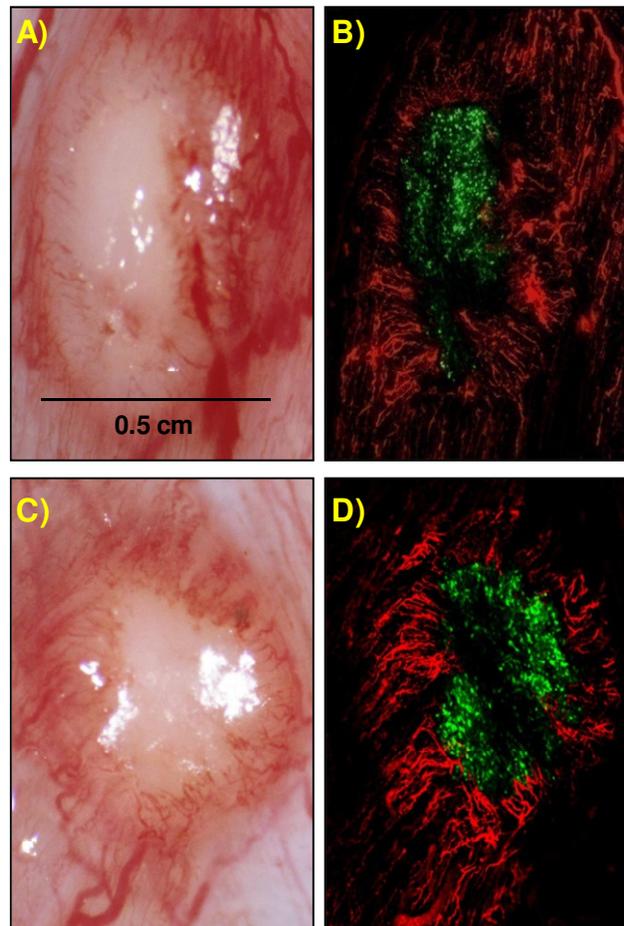
**Figura 30. Cinética de crecimiento tumoral en el músculo cremaster de la rata desnuda.** Se determinó la cinética y propiedades macroscópicas del crecimiento de tumores de células de cáncer de vejiga humana (T-24) implantadas en el músculo cremaster de ratas desnudas. Se infiltraron  $5 \times 10^4$  células T-24 en el músculo y se documentó fotográficamente el crecimiento tumoral a los 10, 20 y 30 días posteriores a la infiltración.



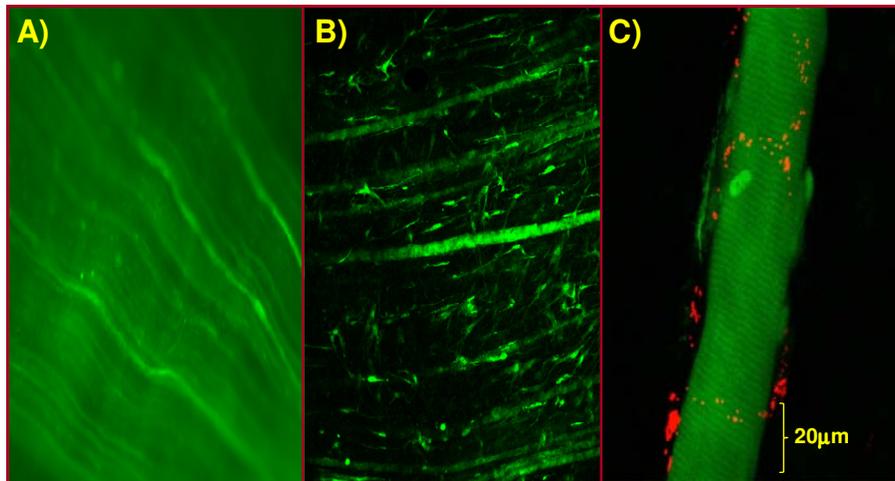
**Figura 31. Desarrollo angiogénico en los tumores crecidos en el músculo cremaster de la rata desnuda.**  $5 \times 10^4$  células de cáncer de vejiga humana (T-24) fueron infiltradas en el músculo cremaster de ratas desnudas. Diez días posteriores a la inoculación de las células tumorales, las ratas fueron sacrificadas, se extrajeron los cremasteres y se montaron en portaobjetos para su observación a mayor magnificación. Se aprecia el desarrollo de vasos sanguíneos concéntricos y edema peritumoral característico de crecimiento tumoral. A) Magnificación 1X del cremaster con masas tumorales a cada lado de la arteria y vena centrales, B) magnificación 2X del tumor izquierdo, C) magnificación 2X del tumor derecho.

Después de documentar el crecimiento de masas tumorales en el cremaster de ratas desnudas, estudiamos la transducibilidad tumoral mediada por adenovirus recombinantes por vía intra arterial. Con este fin, las masas tumorales fueron transducidas durante 1 h por vía intra arterial con adenovirus recombinantes codificantes para la proteína verde fluorescente (Ad.CMV.GFP). Al término de 72 h de la transducción, se contratiñó la vasculatura del músculo cremaster, así como la tumoral, mediante la infusión intra arterial de micro esferas fluorescentes de “rojo de Texas” de 1  $\mu\text{m}$  de diámetro. Se recolectaron los tumores y se observaron bajo microscopía de fluorescencia confocal.

**Figura 32. Transducción adenoviral tumoral por vía intra-arterial.** Se observan tumores de dos animales.  $5 \times 10^4$  células de cáncer de vejiga humana (T-24) fueron infiltradas en el músculo cremaster de ratas desnudas. Diez días posteriores a la inoculación celular las masas tumorales fueron transducidas por vía intra arterial con Ad.CMV.GFP /  $1 \times 10^9$  / 200  $\mu\text{L}$ . Setenta y dos horas posteriores a la transducción, se contratiñó la vasculatura del músculo cremaster así como la tumoral mediante la infusión intra-arterial de micro esferas fluorescentes de “rojo de Texas”. Los tumores se recolectaron y se observaron bajo microscopía de fluorescencia confocal y microscopía convencional. A) Micro-fotografía con magnificación 2X de una masa tumoral, B) Fotografía de microscopía de fluorescencia confocal con magnificación 2X del mismo tumor. C) Micro-fotografía con magnificación 2X de masa tumoral de una segunda rata, D) Fotografía de microscopía de fluorescencia confocal con magnificación 2X del mismo tumor. En ambos animales se observa la expresión difusa de la proteína verde fluorescente en la masa tumoral así como el desarrollo de angiogénesis concéntrica.



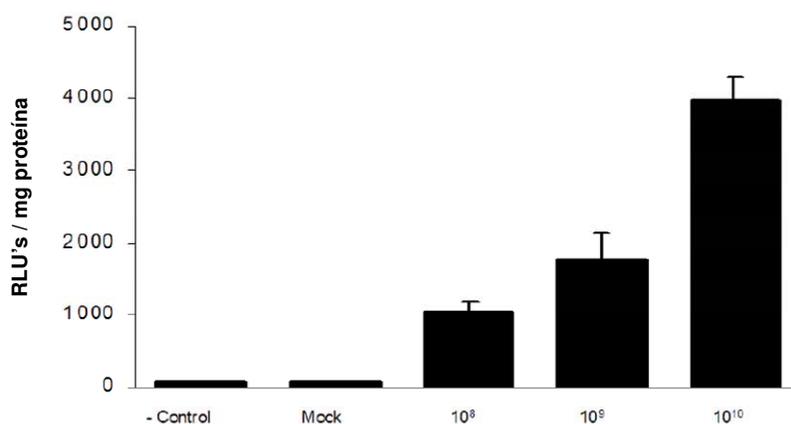
Como puede observarse en la figura 32, se documentó la transducción diseminada de la masa tumoral, además del desarrollo de neovasculatura tumoral concéntrica. Adicionalmente, se observó la transducción de músculo esquelético a lo largo del pedículo muscular (Figura 33).



**Figura 33. Transducción muscular por vía intra-arterial.** Adicionalmente a la presencia de GFP en las masas tumorales se observó la transducción difusa de músculo esquelético a lo largo del pedículo. A) Microfotografía (10X) de músculo esquelético transducido con Ad.CMV.GFP obtenida mediante epifluorescencia. B) Microfotografía mediante fluoroscopia confocal (40X). C) Fibra muscular transducida con Ad.CMV.GFP.

## Curva Dosimétrica Adenoviral

Una vez determinada la transducibilidad y la distribución espacial intra-tumoral del gen reportero GFP, se utilizó un adenovirus recombinante codificante para el gen reportero luciferasa (Ad.CMV.Luc), con el fin de cuantificar la transducción tumoral y su relación con la cantidad de adenovirus infundidos intra-arterialmente. Con este fin, por vía intra arterial se transdujeron las masas tumorales durante 1 h con Ad.CMV.Luc utilizando  $1 \times 10^8$ ,  $1 \times 10^9$   $1 \times 10^{10}$  partículas productoras de placas suspendidas en 200  $\mu$ L de PBS. Después de 72 h posteriores de la transducción, se recolectaron los tumores y se determinó la actividad enzimática intra-tumoral. Los resultados que se presentan en la figura 34 sugieren un incremento en la actividad de la luciferasa intra-tumoral a medida que incrementa la dosis de adenovirus administrada.



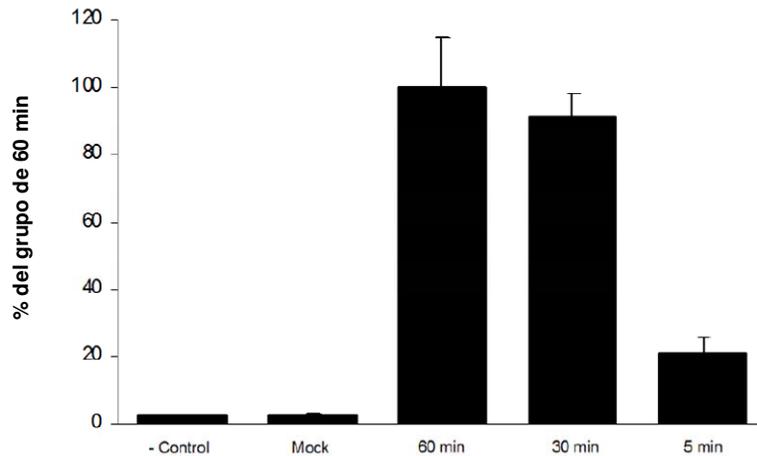
**Figura 34. Curva dosimétrica adenoviral.** Con el objeto de cuantificar la transducción tumoral y su relación con la cantidad de adenovirus infundidos intra-arterialmente se utilizó el adenovirus recombinante codificante para el gen reportero luciferasa (Ad.CMV.Luc). Las masas tumorales fueron transducidas intra-arterialmente durante 1 h como se describe en “materiales y métodos”. Se emplearon un total de  $1 \times 10^8$ ,  $1 \times 10^9$   $1 \times 10^{10}$  partículas formadoras de placas en un volumen total de 200  $\mu$ l. Setenta y dos horas posteriores a la transducción, se recolectaron los tumores y se determinó la actividad enzimática. Las barras representan la media  $\pm$  la desviación estándar (n = 8).

## **Efecto del tiempo de incubación sobre la transducción tumoral mediada por adenovirus recombinantes**

Una particularidad del modelo que se describe es la capacidad de detener el flujo sanguíneo al pedículo muscular por el tiempo deseado, lo cual es posible pinzando los vasos sanguíneos arteriales y venosos (Figura 29).

En los experimentos iniciales, el flujo sanguíneo al pedículo muscular se detuvo durante 60 min con el propósito de propiciar la interacción del adenovirus con los receptores que determinan su transducibilidad en condiciones temporales óptimas. El tiempo de incubación empleado es el rutinario en experimentos en cultivo, dada la biología previamente descrita donde el tiempo óptimo de transducción ha quedado definido (Figura 14).

Sin embargo, no existe hasta ahora un modelo *in vivo* que permita estudiar el efecto que tiene el tiempo de incubación adenoviral sobre la transducibilidad de la masa tumoral. Por otra parte, en un escenario clínico, además del impacto que tiene el tiempo de interacción adenovirus-célula tumoral sobre los perfiles de transducción tumoral, se requeriría de un tiempo óptimo en el cual se lograra obtener una transducción de la masa tumoral óptima sin dañar el órgano por hipoxia prolongada. Lo anterior es posible conseguirlo si se mantienen los tiempos de bloqueo de flujo arterial al mínimo posible. Con este fin, evaluamos los niveles de transducción adenoviral tumoral deteniendo el flujo arterial al músculo cremaster 60, 30 y 5 min. Se utilizó Ad.CMV.Luc como virus reportero y una dosis de  $1 \times 10^{10}$  partículas formadoras de placas. Al término de 72 h de la transducción tumoral adenoviral vía intra arterial los tumores se recolectaron y se evaluó la actividad enzimática. Los resultados que se presentan en la figura 35 sugieren que un tiempo de incubación intra-tumoral de 5 min



**Figura 35. Efecto del tiempo de incubación sobre la transducción tumoral mediada por adenovirus recombinantes.** Con el objeto de permitir la interacción del adenovirus con sus receptores celulares bajo condiciones temporales óptimas, en los experimentos iniciales se detuvo el flujo sanguíneo al pedículo muscular durante la infección adenoviral por un lapso de 60 min. Dicho tiempo de incubación es utilizado rutinariamente en experimentos en cultivo dada la biología previamente discutida. En el presente modelo, es factible la aplicación de “clamps” microquirúrgicos a la arteria y vena iliaca y detener el flujo sanguíneo al pedículo muscular por el tiempo deseado. Lo anterior nos permitió evaluar el efecto que tiene el tiempo de interacción adenovirus-célula tumoral sobre el perfil de transducción tumoral mediada por adenovirus recombinantes. Con este fin se evaluaron los niveles de transducción adenoviral tumoral deteniendo el flujo arterial al músculo cremaster 60 min, 30 min y 5 min. Se utilizó Ad.CMV.Luc como virus reportero y una dosis de  $1 \times 10^{10}$  partículas formadoras de placas en un volumen de 200  $\mu\text{L}$  de PBS. Setenta y dos horas posteriores a la transducción tumoral adenoviral por vía intra-arterial se recolectaron los tumores y se evaluó la actividad enzimática. Las barras representan la media  $\pm$  la desviación estándar ( $n = 8$ ).

genera una transducción del 21% en comparación con el grupo de 60 min que se tomó como el 100%, en tanto que un tiempo de incubación de 30 min generó una transducción del 91%, en comparación con el grupo de 60 min. No se observó una diferencia estadísticamente significativa entre los grupos de 30 y 60 min de incubación ( $p > 0.05$ ). Por los resultados se puede inferir que el tiempo otorgado a la interacción entre el virus y sus receptores es de relevancia para optimizar los perfiles de transducción adenoviral *in vivo*.

## DISCUSIÓN

La transgénesis terapéutica enfocada al cáncer propone diversas estrategias con el objetivo de bloquear la función de proteínas relevantes al fenotipo maligno. Dado que un componente central en la biología de los tumores sólidos es el desarrollo de vasos sanguíneos que permiten crecer a la masa tumoral y generar metástasis, se han descrito diversas estrategias encaminadas a inhibir la angiogénesis tumoral, sin embargo, dentro de esas estrategias no se han descrito anticuerpos de cadena sencilla intracelulares (scFv).

Es por ello que nos propusimos generar un anticuerpo sintético con la capacidad de interactuar intracelularmente con el VEGF-165 humano e inhibir su secreción. Como pudo observarse en la sección de resultados, se armó un scFv con estas propiedades.

Inicialmente, se ensamblaron las regiones variables de las cadenas pesadas y ligeras de una inmunoglobulina con afinidad por Hu-VEGF-165, se ensamblaron en una configuración lineal eslabonada por un brazo flexible  $(\text{Gly}_4 \text{Ser})_3$  creando un anticuerpo de cadena sencilla (scFv) “*single chain Fab variable región*”. Una vez ensamblado, se comprobó su capacidad de inhibir la secreción del factor de crecimiento del endotelio vascular humano isoforma 165, por lo que se procedió a generar un adenovirus recombinante que lo codifica en su genoma. Lo anterior con la finalidad de utilizarlo como un vector transportador eficiente.

El siguiente grupo de experimentos comprenderá la caracterización funcional del scFv a partir del adenovirus recombinante y finalmente su efecto anti angiogénico y anti neoplásico.

Si bien documentamos en un inicio que el anticuerpo es capaz de inhibir la secreción de la isoforma humana 165, será de interés estudiar su afinidad a otras isoformas. Así mismo,

se deben estudiar variantes para su uso. Por un lado, hemos contemplado la posibilidad de expresarlo en forma soluble retirando la secuencia KDEL, para lo cual se contempla utilizar al hígado como plataforma de expresión/secreción. Esto generaría un scFv sintetizado en el hígado y secretado a la circulación sistémica, el cual eventualmente interaccionaría con VEGF-165, situación análoga a la del anticuerpo bevacizumab.

Para que esta estrategia tenga efectos anti-angiogénico y anti-neoplásico, un requisito indispensable es que el scFv sea “neutralizador”, es decir, que el epítipo en VEGF se sitúe en los extremos de la configuración homodimérica antiparalela (Figura 4), los cuales son responsables de su interacción con el receptor. Además, el scFv podría ser dirigido a otros organelos de la célula donde podría ejercer su efecto anti-angiogénico. Por ejemplo, se podría sustituir la secuencia KDEL por una secuencia codificadora para un dominio transmembranal, situando al scFv anclado a la membrana de la célula tumoral “viendo” el espacio extracelular. En este sitio, el scFv anclado tendría una función de “falso receptor”, de tal manera que el VEGF-165 sería “atrapado” en este sitio evitando su difusión hasta su sitio activo en las células endoteliales.

Por otra parte, sería de interés fusionar al scFv con toxinas, tales como la ricina o la toxina de la difteria, lo que generaría una molécula soluble dirigida al endotelio vascular tumoral [117, 118, 223]. En esta estrategia, visualizamos una molécula compuesta de dos dominios funcionales: el primero comprende al scFv y el segundo a la toxina. Al ser sintetizada, la región que comprende al scFv interacciona con VEGF, éste a su vez interacciona con sus receptores en el endotelio vascular en crecimiento, y la toxina ejercería su efecto lítico en el momento de ser endocitada por la célula endotelial, con lo que generaría la

destrucción de la célula endotelial. El efecto neto de miles de estos eventos generaría el colapso de los vasos sanguíneos tumorales y un efecto anti neoplásico.

Especulamos que, debido a que el endotelio vascular tumoral sobre-expresa los receptores para los VEGFs, el efecto tóxico sería dirigido a la vasculatura tumoral [224, 225]. Esta estrategia depende de que el scFv no sea neutralizador, ya que si el scFv impide la interacción de VEGF con sus receptores se perdería la posibilidad de endocitosis y, por ende, la toxicidad dirigida al endotelio vascular tumoral.

Las estrategias propuestas podrían emplearse desde dos plataformas: 1) desde una plataforma de transgénesis en la cual un grupo de células determinadas son transducidas *in vivo* con lo cual se generaría un órgano endocrino sintético para producir la molécula biofuncional, o bien 2) mediante una plataforma de biotecnología convencional, en la cual el compuesto es introducido al paciente en forma de proteína recombinante. Serán de interés los estudios futuros que comparen la efectividad de ambas.

Así mismo, una vez generado el adenovirus recombinante codificante para el scFv anti Hu-VEGF-165, se consideró que para que este logre un efecto anti-angiogénico y anti-tumoral efectivo será necesaria una transducción tumoral eficiente. Por lo anterior, se procedió a estudiar los perfiles de transducción adenoviral en diversas líneas tumorales y primarias provenientes del epitelio de vejiga. Posteriormente, se describieron y se estudiaron los perfiles de transducción adenoviral en un nuevo modelo de transducción tumoral por vía intra-arterial.

En este sentido, si bien se sabe que los adenovirus son tróficos para una gran variedad de estirpes celulares no había reportes de la transducibilidad adenoviral en tejido genito-urinario (GU) [226] por lo que se documentó el comportamiento temporal de los genes

reporteros transducidos por adenovirus recombinantes. Dichos resultados sugieren que se cuenta con una ventana de expresión de 7 días. En un escenario clínico potencial, se esperaría la expresión del gen terapéutico por este lapso.

Además, durante el desarrollo de la presente tesis, se caracterizó un nuevo modelo de transducción tumoral por vía intra arterial. En este sentido, los avances logrados en el desarrollo de nuevas técnicas quirúrgicas en el área de la oncología, han hecho factible el acceso a la masa tumoral por vía intra arterial [227-229]. Inclusive, se han desarrollado estrategias de quimioterapia compartimentalizada en la que pueden suministrarse dosis elevadas en los sitios de crecimiento tumoral primario sin permitir el escape de la quimioterapia a la circulación sistémica. Un ejemplo de lo anterior es la técnica denominada “perfusión aislada”, empleada fundamentalmente en las extremidades, aunque también ha sido empleada en otros órganos [229, 230].

En el campo de la transgénesis terapéutica se ha descrito el acceso arterial a masas tumorales en hígado, por medio de la arteria hepática [231-235]. Sin embargo, con esta estrategia no es factible detener a modo el flujo sanguíneo en su totalidad.

En el modelo animal que se desarrolló en la presente tesis, es factible detener en su totalidad el flujo sanguíneo al sitio de crecimiento tumoral. Esto permite manipular dos variables poco estudiadas hasta la fecha. Primero, el efecto neto que tiene el tiempo otorgado a la interacción entre el adenovirus y los receptores en la célula tumoral *in vivo*, sobre los perfiles de transducción tumoral. En los resultados obtenidos se observa que esta variable es de suma importancia en la transducción tumoral.

Segundo, optimizar la biodisponibilidad de compuestos terapéuticos, incluyendo los diversos vectores, modulando las diferentes variables que caracterizan el microambiente tumoral. En este sentido, para que un compuesto llegue a su sitio activo en la célula tumoral, particularmente en tumores sólidos, este debe librar múltiples barreras anatómicas y fisiológicas. Primero, el compuesto debe viajar por la circulación sistémica, después debe cruzar la pared vascular e ingresar al espacio intersticial, el cual debe atravesar este hasta llegar finalmente a su sitio de bioactividad en la célula tumoral. Además de estas barreras anatómicas se han descrito barreras fisiológicas que también dificultan la biodisponibilidad de compuestos en la masa tumoral [233-237]. En este sentido, se sabe que las presiones intersticiales intratumorales son elevadas, lo que afecta de manera importante la motilidad intratumoral de compuestos mayores a 2 kDa. Por otro lado, la composición de la matriz extracelular afecta la motilidad intratumoral de compuestos menores de 2 kDa. Hasta ahora se han propuesto diversas estrategias para modificar ambas propiedades del microambiente tumoral y mejorar la biodisponibilidad de compuestos antineoplásicos. Por ejemplo, se ha propuesto el uso de fármacos vasodilatadores, o bien el empleo de hipertermia localizada para potenciar el efecto antitumoral de quimio-radioterapia [238, 239].

El modelo que aquí se propone permitiría, mediante la manipulación de los vasos sanguíneos arteriales y venosos, modular las presiones intravasculares con el objeto de vencer las elevadas presiones intersticiales intratumorales, y mejorar la convección de compuestos mayores de 2 kDa (anticuerpos monoclonales y vectores virales entre otros) a través de la masa tumoral.

La biodisponibilidad de compuestos terapéuticos se limita debido al microambiente tumoral caracterizado por: 1) la disposición irregular de los vasos sanguíneos dentro de la

masa tumoral que genera sitios anóxicos, 2) presiones intersticiales elevadas resultado de la desorganizada disposición de matriz extracelular y por la división celular descontrolada en un espacio reducido, lo cual genera gradientes de presión con tendencia a desplazar los compuestos hacia el espacio vascular, y 3) distancias intervasculares elevadas superiores a las 100  $\mu\text{m}$  [233-235]. En el área de la transgénesis terapéutica se tendría que agregar una cuarta variable determinante para la óptima biodisponibilidad y, por lo tanto, para incrementar la transducción de las células que componen la masa tumoral; el tiempo que se otorga para permitir la interacción entre el virus y la célula tumoral.

Los resultados obtenidos durante la caracterización del modelo sugieren que el detener el flujo sanguíneo durante la transducción tumoral por un lapso de 30 minutos genera perfiles de transducción similares a los obtenidos si se detiene el flujo arterial 60 minutos. Debido a que el cerebro y el riñón son órganos sensibles a la anoxia, un escenario clínico de transgénesis intra-arterial en donde se detiene el flujo arterial por 30 minutos no sería viable para estos dos órganos particulares. Sin embargo, podría estudiarse la posibilidad de aplicar esta estrategia en otros órganos menos sensibles a la anoxia.

En un escenario clínico, es posible optimizar los perfiles de transducción tumoral mediante el control del flujo sanguíneo a los vasos que nutren el órgano afectado empleando técnicas quirúrgicas de perfusión aislada. Dichas técnicas de perfusión aislada utilizan bombas extracorpóreas de intercambio gaseoso, lo que permite suministrar  $\text{O}_2$  al órgano o extremidad profundado/a durante el tiempo que el flujo arterial es detenido. El uso de una bomba de intercambio gaseoso eliminaría el elemento de “anoxia” al que sería sometido el tejido en tratamiento. Otra posibilidad es explorar estrategias farmacológicas que modifiquen la cinética

de la infección adenoviral. En este sentido podrían evaluarse compuestos que incrementen la presencia de los receptores responsables de transducción adenoviral (CAR/integrinas) y que quizá expediten la endocitosis del virus reduciendo el tiempo de obstrucción del flujo arterial. Un ejemplo concreto de esto es el empleo de inhibidores de las enzimas histona desacetilasas (*histone deacetylase inhibitors* - iHDACs), los cuales incrementan la expresión del receptor CAR por mecanismos epigenéticos y mejoran los perfiles de transducción adenoviral *in vitro* [240-243], además de que se ha documentado que estos compuestos tienen actividad anti-neoplásica e incrementan la transcripción del gen terapéutico [124, 125, 244-246].

El modelo descrito, además de permitir el control de las variables antes mencionadas, es un modelo compartimentalizado de transgénesis terapéutica que permite purgar al pedículo muscular posterior a la transducción viral, con lo que se impide su escape a la circulación sistémica y, por lo tanto, evitando una “viremia”. Lo anterior sería deseable en un escenario clínico en el cual una viremia no es deseable, especialmente en caso de pacientes con afecciones hepáticas, ya que la tropicidad *in vivo* del adenovirus es principalmente por este órgano [247].

El modelo también puede ser de utilidad en la caracterización de compuestos con toxicidad dirigida a la vasculatura tumoral, ya que como se observó en la figura 32, el tumor y la angiogénesis resultante se desarrollan en el contexto de los vasos sanguíneos normales del cremaster. En este sentido, son de interés los antecedentes en el empleo del modelo de cremaster de rata para el estudio de variables micro-hemodinámicas en otras condiciones patológicas, ya que en estos estudios, el cremaster se transecta por su eje longitudinal y se monta para observación microscópica intra-vital. Durante dichas evaluaciones se hacen mediciones de flujos y diámetros vasculares y de otras variables hemodinámicas a nivel

microvascular [221, 222]. Lo anterior resulta en una posibilidad interesante; el estudio de compuestos con toxicidad dirigida exclusivamente a la vasculatura tumoral, sin afectar los vasos sanguíneos adyacentes normales [161, 248, 249].

El modelo de transducción tumoral intra-arterial será de utilidad también en la evaluación funcional *in vivo* del scFv contra VEGF-165.

Finalmente, debido a que se observó la transducción generalizada a lo largo del pedículo muscular, el modelo podría ser de utilidad para estudiar la corrección por vía intra-arterial de enfermedades genéticas de músculo esquelético por medio de transgénesis.

## **Conclusiones**

Los resultados generados en la presente tesis podrían servir para su aplicación en protocolos de terapia génica de cáncer de vejiga y en otros tipos de tumores sólidos. Por un lado, se armó un anticuerpo de cadena sencilla (scFv) el cual, al ser expresado en células neoplásicas, interacciona intracelularmente con el factor de crecimiento del endotelio vascular isoforma 165 humano e inhibe su secreción. Adicionalmente, se estudió la transducibilidad en células de cáncer de vejiga mediada por adenovirus, y se documentó que son transducibles. Finalmente, se caracterizó un nuevo modelo de transducción tumoral por vía intra-arterial en el cual es posible manipular algunas de las variables claves en el proceso de transducción mediada por adenovirus recombinantes.

## REFERENCIAS

1. Land, H., L.F. Parada, and R.A. Weinberg, *Cellular oncogenes and multistep carcinogenesis*. Science, 1983. **222**(4625): p. 771-8.
2. Weinberg, R.A., *A molecular basis of cancer*. Sci Am, 1983. **249**(5): p. 126-42.
3. Weinberg, R.A., *Oncogenes*. CA Cancer J Clin, 1983. **33**(5): p. 300-6.
4. Weinberg, R.A., *Oncogenes and the molecular biology of cancer*. J Cell Biol, 1983. **97**(6): p. 1661-2.
5. Fearon, E.R. and B. Vogelstein, *A genetic model for colorectal tumorigenesis*. Cell, 1990. **61**(5): p. 759-67.
6. Jen, J., et al., *Molecular determinants of dysplasia in colorectal lesions*. Cancer Res, 1994. **54**(21): p. 5523-6.
7. Leong, S.P., et al., *Patterns of metastasis in human solid cancers*. Cancer Treat Res, 2007. **135**: p. 209-21.
8. Campoli, M., et al., *Mechanisms of tumor evasion*. Cancer Treat Res, 2005. **123**: p. 61-88.
9. Rodriguez, P.C., A.H. Zea, and A.C. Ochoa, *Mechanisms of tumor evasion from the immune response*. Cancer Chemother Biol Response Modif, 2003. **21**: p. 351-64.
10. Piris, A. and M.C. Mihm, Jr., *Mechanisms of metastasis: seed and soil*. Cancer Treat Res, 2007. **135**: p. 119-27.
11. Folkman, J., et al., *Induction of angiogenesis during the transition from hyperplasia to neoplasia*. Nature, 1989. **339**(6219): p. 58-61.
12. Folkman, J., *Anti-angiogenesis: new concept for therapy of solid tumors*. Ann Surg, 1972. **175**(3): p. 409-16.
13. Folkman, J., *The role of angiogenesis in tumor growth*. Semin Cancer Biol, 1992. **3**(2): p. 65-71.
14. Folkman, J., *What is the evidence that tumors are angiogenesis dependent?* J Natl Cancer Inst, 1990. **82**(1): p. 4-6.
15. Verheul, H.M., E.E. Voest, and R.O. Schlingemann, *Are tumours angiogenesis-dependent?* J Pathol, 2004. **202**(1): p. 5-13.
16. Folkman, J., *Seminars in Medicine of the Beth Israel Hospital, Boston. Clinical applications of research on angiogenesis*. N Engl J Med, 1995. **333**(26): p. 1757-63.

17. Battegay, E.J., *Angiogenesis: mechanistic insights, neovascular diseases, and therapeutic prospects*. J Mol Med, 1995. **73**(7): p. 333-46.
18. Paweletz, N. and H.J. Boxberger, *Defined tumor cell-host interactions are necessary for malignant growth*. Crit Rev Oncog, 1994. **5**(1): p. 69-105.
19. Brown, J.M. and A.J. Giaccia, *The unique physiology of solid tumors: opportunities (and problems) for cancer therapy*. Cancer Res, 1998. **58**(7): p. 1408-16.
20. Skobe, M., et al., *Halting angiogenesis suppresses carcinoma cell invasion*. Nat Med, 1997. **3**(11): p. 1222-7.
21. Borgstrom, P., et al., *Complete inhibition of angiogenesis and growth of microtumors by anti-vascular endothelial growth factor neutralizing antibody: novel concepts of angiostatic therapy from intravital videomicroscopy*. Cancer Res, 1996. **56**(17): p. 4032-9.
22. Fan, T.P., R. Jaggard, and R. Bicknell, *Controlling the vasculature: angiogenesis, anti-angiogenesis and vascular targeting of gene therapy*. Trends Pharmacol Sci, 1995. **16**(2): p. 57-66.
23. Chen, C., et al., *A strategy to discover circulating angiogenesis inhibitors generated by human tumors*. Cancer Res, 1995. **55**(19): p. 4230-3.
24. Teicher, B.A., E.A. Sotomayor, and Z.D. Huang, *Antiangiogenic agents potentiate cytotoxic cancer therapies against primary and metastatic disease*. Cancer Res, 1992. **52**(23): p. 6702-4.
25. Burrows, F.J., Y. Watanabe, and P.E. Thorpe, *A murine model for antibody-directed targeting of vascular endothelial cells in solid tumors*. Cancer Res, 1992. **52**(21): p. 5954-62.
26. Burrows, F.J. and P.E. Thorpe, *Vascular targeting--a new approach to the therapy of solid tumors*. Pharmacol Ther, 1994. **64**(1): p. 155-74.
27. Fidler, I.J. and L.M. Ellis, *The implications of angiogenesis for the biology and therapy of cancer metastasis*. Cell, 1994. **79**(2): p. 185-8.
28. Hayes, A.J., L.Y. Li, and M.E. Lippman, *Science, medicine, and the future. Antivascular therapy: a new approach to cancer treatment*. Bmj, 1999. **318**(7187): p. 853-6.
29. McCarty, M.F., et al., *Promises and pitfalls of anti-angiogenic therapy in clinical trials*. Trends Mol Med, 2003. **9**(2): p. 53-8.
30. Folkman, J., *Angiogenesis in cancer, vascular, rheumatoid and other disease*. Nat Med, 1995. **1**(1): p. 27-31.

31. Blood, C.H. and B.R. Zetter, *Tumor interactions with the vasculature: angiogenesis and tumor metastasis*. *Biochim Biophys Acta*, 1990. **1032**(1): p. 89-118.
32. Hirashima, M., et al., *Maturation of embryonic stem cells into endothelial cells in an in vitro model of vasculogenesis*. *Blood*, 1999. **93**(4): p. 1253-63.
33. Beck, L., Jr. and P.A. D'Amore, *Vascular development: cellular and molecular regulation*. *Faseb J*, 1997. **11**(5): p. 365-73.
34. Vittet, D., et al., *Embryonic stem cells differentiate in vitro to endothelial cells through successive maturation steps*. *Blood*, 1996. **88**(9): p. 3424-31.
35. Schaper, W. and I. Buschmann, *Arteriogenesis, the good and bad of it*. *Eur Heart J*, 1999. **20**(18): p. 1297-9.
36. Schaper, W. and D. Scholz, *Factors regulating arteriogenesis*. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2003. **23**(7): p. 1143-51.
37. Buschmann, I. and W. Schaper, *Arteriogenesis Versus Angiogenesis: Two Mechanisms of Vessel Growth*. *News Physiol Sci*, 1999. **14**: p. 121-125.
38. Denekamp, J., *Vascular attack as a therapeutic strategy for cancer*. *Cancer Metastasis Rev*, 1990. **9**(3): p. 267-82.
39. Senger, D.R., *Molecular framework for angiogenesis: a complex web of interactions between extravasated plasma proteins and endothelial cell proteins induced by angiogenic cytokines*. *Am J Pathol*, 1996. **149**(1): p. 1-7.
40. Kalebic, T., et al., *Basement membrane collagen: degradation by migrating endothelial cells*. *Science*, 1983. **221**(4607): p. 281-3.
41. Liotta, L.A., P.S. Steeg, and W.G. Stetler-Stevenson, *Cancer metastasis and angiogenesis: an imbalance of positive and negative regulation*. *Cell*, 1991. **64**(2): p. 327-36.
42. Folkman, J. and M. Klagsbrun, *Angiogenic factors*. *Science*, 1987. **235**(4787): p. 442-7.
43. Takahashi, T., et al., *Ischemia- and cytokine-induced mobilization of bone marrow-derived endothelial progenitor cells for neovascularization*. *Nat Med*, 1999. **5**(4): p. 434-8.
44. Asahara, T., et al., *Bone marrow origin of endothelial progenitor cells responsible for postnatal vasculogenesis in physiological and pathological neovascularization*. *Circ Res*, 1999. **85**(3): p. 221-8.
45. Asahara, T., et al., *VEGF contributes to postnatal neovascularization by mobilizing bone marrow-derived endothelial progenitor cells*. *Embo J*, 1999. **18**(14): p. 3964-72.

46. Senger, D.R., et al., *Vascular permeability factor, tumor angiogenesis and stroma generation*. *Invasion Metastasis*, 1994. **14**(1-6): p. 385-94.
47. Dvorak, H.F., et al., *Vascular permeability factor/vascular endothelial growth factor, microvascular hyperpermeability, and angiogenesis*. *Am J Pathol*, 1995. **146**(5): p. 1029-39.
48. Tait, C.R. and P.F. Jones, *Angiopoietins in tumours: the angiogenic switch*. *J Pathol*, 2004. **204**(1): p. 1-10.
49. Ribatti, D., et al., *The history of the angiogenic switch concept*. *Leukemia*, 2007. **21**(1): p. 44-52.
50. North, S., M. Moenner, and A. Bikfalvi, *Recent developments in the regulation of the angiogenic switch by cellular stress factors in tumors*. *Cancer Lett*, 2005. **218**(1): p. 1-14.
51. Bergers, G. and L.E. Benjamin, *Tumorigenesis and the angiogenic switch*. *Nat Rev Cancer*, 2003. **3**(6): p. 401-10.
52. Tosetti, F., R. Benelli, and A. Albini, *The angiogenic switch in solid tumors: clinical implications*. *Suppl Tumori*, 2002. **1**(6): p. S9-11.
53. Giordano, F.J. and R.S. Johnson, *Angiogenesis: the role of the microenvironment in flipping the switch*. *Curr Opin Genet Dev*, 2001. **11**(1): p. 35-40.
54. Hanahan, D., et al., *Transgenic mouse models of tumour angiogenesis: the angiogenic switch, its molecular controls, and prospects for preclinical therapeutic models*. *Eur J Cancer*, 1996. **32A**(14): p. 2386-93.
55. Kunz, M. and S.M. Ibrahim, *Molecular responses to hypoxia in tumor cells*. *Mol Cancer*, 2003. **2**: p. 23.
56. Levy, A.P., et al., *Transcriptional regulation of the rat vascular endothelial growth factor gene by hypoxia*. *J Biol Chem*, 1995. **270**(22): p. 13333-40.
57. Minchenko, A., et al., *Hypoxic stimulation of vascular endothelial growth factor expression in vitro and in vivo*. *Lab Invest*, 1994. **71**(3): p. 374-9.
58. Choi, K.S., et al., *Hypoxia-induced angiogenesis during carcinogenesis*. *J Biochem Mol Biol*, 2003. **36**(1): p. 120-7.
59. Dachs, G.U. and G.M. Tozer, *Hypoxia modulated gene expression: angiogenesis, metastasis and therapeutic exploitation*. *Eur J Cancer*, 2000. **36**(13 Spec No): p. 1649-60.
60. Ryan, H.E., et al., *Hypoxia-inducible factor-1alpha is a positive factor in solid tumor growth*. *Cancer Res*, 2000. **60**(15): p. 4010-5.

61. Rak, J. and J.L. Yu, *Oncogenes and tumor angiogenesis: the question of vascular "supply" and vascular "demand"*. *Semin Cancer Biol*, 2004. **14**(2): p. 93-104.
62. Rak, J., et al., *Oncogenes and angiogenesis: signaling three-dimensional tumor growth*. *J Investig Dermatol Symp Proc*, 2000. **5**(1): p. 24-33.
63. Rak, J., et al., *Oncogenes as inducers of tumor angiogenesis*. *Cancer Metastasis Rev*, 1995. **14**(4): p. 263-77.
64. Kranenburg, O., M.F. Gebbink, and E.E. Voest, *Stimulation of angiogenesis by Ras proteins*. *Biochim Biophys Acta*, 2004. **1654**(1): p. 23-37.
65. Hasan, J. and G.C. Jayson, *VEGF antagonists*. *Expert Opin Biol Ther*, 2001. **1**(4): p. 703-18.
66. Glade-Bender, J., J.J. Kandel, and D.J. Yamashiro, *VEGF blocking therapy in the treatment of cancer*. *Expert Opin Biol Ther*, 2003. **3**(2): p. 263-76.
67. Manley, P.W., et al., *Therapies directed at vascular endothelial growth factor*. *Expert Opin Investig Drugs*, 2002. **11**(12): p. 1715-36.
68. Ribatti, D., *The crucial role of vascular permeability factor/vascular endothelial growth factor in angiogenesis: a historical review*. *Br J Haematol*, 2005. **128**(3): p. 303-9.
69. Hoeben, A., et al., *Vascular endothelial growth factor and angiogenesis*. *Pharmacol Rev*, 2004. **56**(4): p. 549-80.
70. Ferrara, N. and T. Davis-Smyth, *The biology of vascular endothelial growth factor*. *Endocr Rev*, 1997. **18**(1): p. 4-25.
71. Robinson, C.J. and S.E. Stringer, *The splice variants of vascular endothelial growth factor (VEGF) and their receptors*. *J Cell Sci*, 2001. **114**(Pt 5): p. 853-65.
72. Olofsson, B., et al., *Vascular endothelial growth factor B, a novel growth factor for endothelial cells*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1996. **93**(6): p. 2576-81.
73. Enholm, B., et al., *Comparison of VEGF, VEGF-B, VEGF-C and Ang-1 mRNA regulation by serum, growth factors, oncoproteins and hypoxia*. *Oncogene*, 1997. **14**(20): p. 2475-83.
74. Joukov, V., et al., *Vascular endothelial growth factors VEGF-B and VEGF-C*. *J Cell Physiol*, 1997. **173**(2): p. 211-5.
75. Witzenbichler, B., et al., *Vascular endothelial growth factor-C (VEGF-C/VEGF-2) promotes angiogenesis in the setting of tissue ischemia*. *Am J Pathol*, 1998. **153**(2): p. 381-94.

76. Yamada, Y., et al., *Molecular cloning of a novel vascular endothelial growth factor, VEGF-D*. Genomics, 1997. **42**(3): p. 483-8.
77. Ogawa, S., et al., *A novel type of vascular endothelial growth factor, VEGF-E (NZ-7 VEGF), preferentially utilizes KDR/Flk-1 receptor and carries a potent mitotic activity without heparin-binding domain*. J Biol Chem, 1998. **273**(47): p. 31273-82.
78. Tischer, E., et al., *The human gene for vascular endothelial growth factor. Multiple protein forms are encoded through alternative exon splicing*. J Biol Chem, 1991. **266**(18): p. 11947-54.
79. Vincenti, V., et al., *Assignment of the vascular endothelial growth factor gene to human chromosome 6p21.3*. Circulation, 1996. **93**(8): p. 1493-5.
80. Muller, Y.A., et al., *Vascular endothelial growth factor: crystal structure and functional mapping of the kinase domain receptor binding site*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1997. **94**(14): p. 7192-7.
81. Muller, Y.A., et al., *The cystine knot promotes folding and not thermodynamic stability in vascular endothelial growth factor*. J Biol Chem, 2002. **277**(45): p. 43410-6.
82. Ortega, N., H. Hutchings, and J. Plouet, *Signal relays in the VEGF system*. Front Biosci, 1999. **4**: p. D141-52.
83. Houck, K.A., et al., *Dual regulation of vascular endothelial growth factor bioavailability by genetic and proteolytic mechanisms*. J Biol Chem, 1992. **267**(36): p. 26031-7.
84. Ristimaki, A., et al., *Proinflammatory cytokines regulate expression of the lymphatic endothelial mitogen vascular endothelial growth factor-C*. J Biol Chem, 1998. **273**(14): p. 8413-8.
85. Bermont, L., et al., *Regulation of vascular endothelial growth factor expression by insulin-like growth factor-I in endometrial adenocarcinoma cells*. Int J Cancer, 2000. **85**(1): p. 117-23.
86. Akagi, Y., et al., *Regulation of vascular endothelial growth factor expression in human colon cancer by insulin-like growth factor-I*. Cancer Res, 1998. **58**(17): p. 4008-14.
87. Hyder, S.M. and G.M. Stancel, *Regulation of angiogenic growth factors in the female reproductive tract by estrogens and progestins*. Mol Endocrinol, 1999. **13**(6): p. 806-11.
88. Ruohola, J.K., et al., *Vascular endothelial growth factors are differentially regulated by steroid hormones and antiestrogens in breast cancer cells*. Mol Cell Endocrinol, 1999. **149**(1-2): p. 29-40.

89. Claffey, K.P., D.R. Senger, and B.M. Spiegelman, *Structural requirements for dimerization, glycosylation, secretion, and biological function of VPF/VEGF*. *Biochim Biophys Acta*, 1995. **1246**(1): p. 1-9.
90. Potgens, A.J., et al., *Covalent dimerization of vascular permeability factor/vascular endothelial growth factor is essential for its biological activity. Evidence from Cys to Ser mutations*. *J Biol Chem*, 1994. **269**(52): p. 32879-85.
91. Shibuya, M., *Structure and function of VEGF/VEGF-receptor system involved in angiogenesis*. *Cell Struct Funct*, 2001. **26**(1): p. 25-35.
92. Wiesmann, C., et al., *Crystal structure at 1.7 Å resolution of VEGF in complex with domain 2 of the Flt-1 receptor*. *Cell*, 1997. **91**(5): p. 695-704.
93. Walsh, T.P. and G.H. Grant, *Computer modelling of the receptor-binding domains of VEGF and PlGF*. *Protein Eng*, 1997. **10**(4): p. 389-98.
94. Quinn, T.P., et al., *Fetal liver kinase 1 is a receptor for vascular endothelial growth factor and is selectively expressed in vascular endothelium*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1993. **90**(16): p. 7533-7.
95. Neufeld, G., et al., *Vascular endothelial growth factor (VEGF) and its receptors*. *Faseb J*, 1999. **13**(1): p. 9-22.
96. Shibuya, M., *Differential roles of vascular endothelial growth factor receptor-1 and receptor-2 in angiogenesis*. *J Biochem Mol Biol*, 2006. **39**(5): p. 469-78.
97. Kendall, R.L. and K.A. Thomas, *Inhibition of vascular endothelial cell growth factor activity by an endogenously encoded soluble receptor*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1993. **90**(22): p. 10705-9.
98. Achen, M.G., et al., *Vascular endothelial growth factor D (VEGF-D) is a ligand for the tyrosine kinases VEGF receptor 2 (Flk1) and VEGF receptor 3 (Flt4)*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1998. **95**(2): p. 548-53.
99. Byzova, T.V., et al., *Adenovirus encoding vascular endothelial growth factor-D induces tissue-specific vascular patterns in vivo*. *Blood*, 2002. **99**(12): p. 4434-42.
100. Tessler, S., et al., *Heparin modulates the interaction of VEGF165 with soluble and cell associated flk-1 receptors*. *J Biol Chem*, 1994. **269**(17): p. 12456-61.
101. Davis-Smyth, T., et al., *The second immunoglobulin-like domain of the VEGF tyrosine kinase receptor Flt-1 determines ligand binding and may initiate a signal transduction cascade*. *Embo J*, 1996. **15**(18): p. 4919-27.
102. Barleon, B., et al., *Mapping of the sites for ligand binding and receptor dimerization at the extracellular domain of the vascular endothelial growth factor receptor FLT-1*. *J Biol Chem*, 1997. **272**(16): p. 10382-8.

103. Fuh, G., et al., *Requirements for binding and signaling of the kinase domain receptor for vascular endothelial growth factor*. J Biol Chem, 1998. **273**(18): p. 11197-204.
104. Moldovan, L. and N.I. Moldovan, *Role of monocytes and macrophages in angiogenesis*. Exs, 2005(94): p. 127-46.
105. Sunderkotter, C., et al., *Macrophages and angiogenesis*. J Leukoc Biol, 1994. **55**(3): p. 410-22.
106. Freeman, M.R., et al., *Peripheral blood T lymphocytes and lymphocytes infiltrating human cancers express vascular endothelial growth factor: a potential role for T cells in angiogenesis*. Cancer Res, 1995. **55**(18): p. 4140-5.
107. Fabre, J.W., et al., *Hydrodynamic gene delivery to the pig liver via an isolated segment of the inferior vena cava*. Gene Ther, 2007.
108. Morabito, A., et al., *Tyrosine kinase inhibitors of vascular endothelial growth factor receptors in clinical trials: current status and future directions*. Oncologist, 2006. **11**(7): p. 753-64.
109. Steven M. Chamow, A.A., *Antibody Fusion Proteins*. 1999, New York, NY: John Wiley & Sons, Inc.
110. Filpula, D., *Antibody engineering and modification technologies*. Biomol Eng, 2007. **24**(2): p. 201-15.
111. Roitt, I., *Essential Immunology*. 1994, Oxford, England: Blackwell Scientific Publications.
112. Jane, C.A., Travers Paul, *Immunobiology: The Immune System in Health and Disease*. . 1996, New York, NY: Garland Publishing.
113. Deshane, J., et al., *Targeted eradication of ovarian cancer mediated by intracellular expression of anti-erbB-2 single-chain antibody*. Gynecol Oncol, 1995. **59**(1): p. 8-14.
114. Deshane, J., et al., *Targeted tumor killing via an intracellular antibody against erbB-2*. J Clin Invest, 1995. **96**(6): p. 2980-9.
115. Vitaliti, A., et al., *Inhibition of tumor angiogenesis by a single-chain antibody directed against vascular endothelial growth factor*. Cancer Res, 2000. **60**(16): p. 4311-4.
116. Afanasieva, T.A., et al., *Single-chain antibody and its derivatives directed against vascular endothelial growth factor: application for antiangiogenic gene therapy*. Gene Ther, 2003. **10**(21): p. 1850-9.
117. Holliger, P. and P.J. Hudson, *Engineered antibody fragments and the rise of single domains*. Nat Biotechnol, 2005. **23**(9): p. 1126-36.

118. Kim, G.B., et al., *A fold-back single-chain diabody format enhances the bioactivity of an anti-monkey CD3 recombinant diphtheria toxin-based immunotoxin*. Protein Eng Des Sel, 2007. **20**(9): p. 425-32.
119. Halin, C., et al., *Tumor-targeting properties of antibody-vascular endothelial growth factor fusion proteins*. Int J Cancer, 2002. **102**(2): p. 109-16.
120. Beckman, R.A., L.M. Weiner, and H.M. Davis, *Antibody constructs in cancer therapy: protein engineering strategies to improve exposure in solid tumors*. Cancer, 2007. **109**(2): p. 170-9.
121. Lobato, M.N. and T.H. Rabbitts, *Intracellular antibodies as specific reagents for functional ablation: future therapeutic molecules*. Curr Mol Med, 2004. **4**(5): p. 519-28.
122. Haubner, R. and H.J. Wester, *Radiolabeled tracers for imaging of tumor angiogenesis and evaluation of anti-angiogenic therapies*. Curr Pharm Des, 2004. **10**(13): p. 1439-55.
123. Colcher, D., et al., *Pharmacokinetics and biodistribution of genetically-engineered antibodies*. Q J Nucl Med, 1998. **42**(4): p. 225-41.
124. Stebbing, J., et al., *Epigenetics: an emerging technology in the diagnosis and treatment of cancer*. Pharmacogenomics, 2006. **7**(5): p. 747-57.
125. Jones, P.A. and S.B. Baylin, *The fundamental role of epigenetic events in cancer*. Nat Rev Genet, 2002. **3**(6): p. 415-28.
126. Balmain, A., J. Gray, and B. Ponder, *The genetics and genomics of cancer*. Nat Genet, 2003. **33 Suppl**: p. 238-44.
127. Maiello, E., et al., *Cetuximab: clinical results in colorectal cancer*. Ann Oncol, 2007. **18 Suppl 6**: p. vi8-10.
128. Kharfan-Dabaja, M.A., et al., *Evolving role of monoclonal antibodies in the treatment of chronic lymphocytic leukemia*. Expert Opin Investig Drugs, 2007. **16**(11): p. 1799-815.
129. Karamouzis, M.V. and A. Argiris, *Update on the role of EGFR inhibitors in cancer therapeutics*. Cancer Treat Res, 2007. **135**: p. 257-75.
130. Wanebo, H.J., D. Berz, and A. Mega, *Targeting small molecules in cancer*. Cancer Treat Res, 2007. **135**: p. 239-55.
131. Smith, L.T., G.A. Otterson, and C. Plass, *Unraveling the epigenetic code of cancer for therapy*. Trends Genet, 2007. **23**(9): p. 449-56.

132. Schneider-Stock, R. and M. Ocker, *Epigenetic therapy in cancer: molecular background and clinical development of histone deacetylase and DNA methyltransferase inhibitors*. IDrugs, 2007. **10**(8): p. 557-61.
133. Scholl, S.M., S. Michaelis, and R. McDermott, *Gene Therapy Applications to Cancer Treatment*. J Biomed Biotechnol, 2003. **2003**(1): p. 35-47.
134. Crystal, R.G., *In vivo and ex vivo gene therapy strategies to treat tumors using adenovirus gene transfer vectors*. Cancer Chemother Pharmacol, 1999. **43 Suppl**: p. S90-9.
135. El-Aneed, A., *Current strategies in cancer gene therapy*. Eur J Pharmacol, 2004. **498**(1-3): p. 1-8.
136. Biagi, E., et al., *Gene Therapy for Pediatric Cancer: State of the Art and Future Perspectives*. J Biomed Biotechnol, 2003. **2003**(1): p. 13-24.
137. Fleischman, R.A., *Human gene therapy*. Am J Med Sci, 1991. **301**(5): p. 353-63.
138. McCabe, E.R., *Clinical application of gene therapy: emerging opportunities and current limitations*. Biochem Med Metab Biol, 1993. **50**(3): p. 241-53.
139. Ledley, F.D., *Hepatic gene therapy: present and future*. Hepatology, 1993. **18**(5): p. 1263-73.
140. Moseley, A.B. and C.T. Caskey, *Prospects for human gene therapy*. Genet Eng (N Y), 1993. **15**: p. 213-23.
141. Lyerly, H.K. and J.M. DiMaio, *Gene delivery systems in surgery*. Arch Surg, 1993. **128**(11): p. 1197-206.
142. Lieber, A., et al., *The role of Kupffer cell activation and viral gene expression in early liver toxicity after infusion of recombinant adenovirus vectors*. J Virol, 1997. **71**(11): p. 8798-807.
143. Russell, S.J., *Science, medicine, and the future. Gene therapy*. Bmj, 1997. **315**(7118): p. 1289-92.
144. Gibaldi, M., *Human gene therapy*. Pharmacotherapy, 1993. **13**(2): p. 79-87.
145. Roemer, K. and T. Friedmann, *Concepts and strategies for human gene therapy*. Eur J Biochem, 1992. **208**(2): p. 211-25.
146. O'Malley, B.W., Jr. and F.D. Ledley, *Somatic gene therapy. Methods for the present and future*. Arch Otolaryngol Head Neck Surg, 1993. **119**(10): p. 1100-7.
147. Crystal, R.G., *The gene as the drug*. Nat Med, 1995. **1**(1): p. 15-7.

148. Anderson, W.F., *Human gene therapy*. Science, 1992. **256**(5058): p. 808-13.
149. Kelley, W.N., *Gene therapy in humans: a new era begins*. Ann Intern Med, 1991. **114**(8): p. 697-8.
150. Spink, J. and D. Geddes, *Gene therapy progress and prospects: bringing gene therapy into medical practice: the evolution of international ethics and the regulatory environment*. Gene Ther, 2004. **11**(22): p. 1611-6.
151. Kong, H.L. and R.G. Crystal, *Gene therapy strategies for tumor antiangiogenesis*. J Natl Cancer Inst, 1998. **90**(4): p. 273-86.
152. Bossi, G. and A. Sacchi, *Restoration of wild-type p53 function in human cancer: relevance for tumor therapy*. Head Neck, 2007. **29**(3): p. 272-84.
153. Guan, Y.S. and Y. Liu, *Interventional treatments for hepatocellular carcinoma*. Hepatobiliary Pancreat Dis Int, 2006. **5**(4): p. 495-500.
154. Roth, J.A., *Adenovirus p53 gene therapy*. Expert Opin Biol Ther, 2006. **6**(1): p. 55-61.
155. Podhajcer, O.L., M.V. Lopez, and G. Mazzolini, *Cytokine gene transfer for cancer therapy*. Cytokine Growth Factor Rev, 2007. **18**(1-2): p. 183-94.
156. Glick, R.P., T. Lichtor, and E.P. Cohen, *Cytokine immunogene therapy*. Neurosurg Focus, 2000. **9**(6): p. e2.
157. Dachs, G.U., J. Tupper, and G.M. Tozer, *From bench to bedside for gene-directed enzyme prodrug therapy of cancer*. Anticancer Drugs, 2005. **16**(4): p. 349-59.
158. Schepelmann, S. and C.J. Springer, *Viral vectors for gene-directed enzyme prodrug therapy*. Curr Gene Ther, 2006. **6**(6): p. 647-70.
159. Portsmouth, D., J. Hlavaty, and M. Renner, *Suicide genes for cancer therapy*. Mol Aspects Med, 2007. **28**(1): p. 4-41.
160. Tandle, A., D.G. Blazer, 3rd, and S.K. Libutti, *Antiangiogenic gene therapy of cancer: recent developments*. J Transl Med, 2004. **2**(1): p. 22.
161. Bazan-Peregrino, M., L.W. Seymour, and A.L. Harris, *Gene therapy targeting to tumor endothelium*. Cancer Gene Ther, 2007. **14**(2): p. 117-27.
162. Persano, L., M. Crescenzi, and S. Indraccolo, *Anti-angiogenic gene therapy of cancer: current status and future prospects*. Mol Aspects Med, 2007. **28**(1): p. 87-114.
163. Isayeva, T., S. Kumar, and S. Ponnazhagan, *Anti-angiogenic gene therapy for cancer (review)*. Int J Oncol, 2004. **25**(2): p. 335-43.

164. Medina, M.A., R. Munoz-Chapuli, and A.R. Quesada, *Challenges of antiangiogenic cancer therapy: trials and errors, and renewed hope*. J Cell Mol Med, 2007. **11**(3): p. 374-82.
165. Nesbit, M., *Abrogation of tumor vasculature using gene therapy*. Cancer Metastasis Rev, 2000. **19**(1-2): p. 45-9.
166. O'Reilly, M.S., et al., *Angiostatin: a circulating endothelial cell inhibitor that suppresses angiogenesis and tumor growth*. Cold Spring Harb Symp Quant Biol, 1994. **59**: p. 471-82.
167. O'Reilly, M.S., et al., *Endostatin: an endogenous inhibitor of angiogenesis and tumor growth*. Cell, 1997. **88**(2): p. 277-85.
168. Clapp, C., et al., *The 16-kilodalton N-terminal fragment of human prolactin is a potent inhibitor of angiogenesis*. Endocrinology, 1993. **133**(3): p. 1292-9.
169. Dell'Eva, R., et al., *Inhibition of tumor angiogenesis by angiostatin: from recombinant protein to gene therapy*. Endothelium, 2002. **9**(1): p. 3-10.
170. Ziche, M., S. Donnini, and L. Morbidelli, *Development of new drugs in angiogenesis*. Curr Drug Targets, 2004. **5**(5): p. 485-93.
171. Kerbel, R.S., *Inhibition of tumor angiogenesis as a strategy to circumvent acquired resistance to anti-cancer therapeutic agents*. Bioessays, 1991. **13**(1): p. 31-6.
172. Morino, F., et al., *Hammerhead ribozyme specifically inhibits vascular endothelial growth factor gene expression in a human hepatocellular carcinoma cell line*. Int J Oncol, 2000. **17**(3): p. 495-9.
173. Lu, P.Y., F.Y. Xie, and M.C. Woodle, *Modulation of angiogenesis with siRNA inhibitors for novel therapeutics*. Trends Mol Med, 2005. **11**(3): p. 104-13.
174. Cheng, S.Y., et al., *Suppression of glioblastoma angiogenicity and tumorigenicity by inhibition of endogenous expression of vascular endothelial growth factor*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1996. **93**(16): p. 8502-7.
175. Ke, L.D., et al., *A novel approach to glioma gene therapy: down-regulation of the vascular endothelial growth factor in glioma cells using ribozymes*. Int J Oncol, 1998. **12**(6): p. 1391-6.
176. Goldman, C.K., et al., *Paracrine expression of a native soluble vascular endothelial growth factor receptor inhibits tumor growth, metastasis, and mortality rate*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1998. **95**(15): p. 8795-800.
177. Zogakis, T.G. and S.K. Libutti, *General aspects of anti-angiogenesis and cancer therapy*. Expert Opin Biol Ther, 2001. **1**(2): p. 253-75.

178. Graepler, F., et al., *Combined endostatin/sFlt-1 antiangiogenic gene therapy is highly effective in a rat model of HCC*. Hepatology, 2005. **41**(4): p. 879-86.
179. Sun, X., et al., *Intramuscular delivery of antiangiogenic genes suppresses secondary metastases after removal of primary tumors*. Cancer Gene Ther, 2005. **12**(1): p. 35-45.
180. Indraccolo, S., et al., *Generation of expression plasmids for angiostatin, endostatin and TIMP-2 for cancer gene therapy*. Int J Biol Markers, 1999. **14**(4): p. 251-6.
181. Seth, P., *Vector-mediated cancer gene therapy: an overview*. Cancer Biol Ther, 2005. **4**(5): p. 512-7.
182. Holzman, D., *Gene therapy depends on finding the right vector*. J Natl Cancer Inst, 1995. **87**(6): p. 406-10.
183. Kaplan, J.M., *Adenovirus-based cancer gene therapy*. Curr Gene Ther, 2005. **5**(6): p. 595-605.
184. Jolly, D., *Viral vector systems for gene therapy*. Cancer Gene Ther, 1994. **1**(1): p. 51-64.
185. Channon, K.M. and S.E. George, *Improved adenoviral vectors: cautious optimism for gene therapy*. Qjm, 1997. **90**(2): p. 105-9.
186. Trapnell, B.C. and M. Gorziglia, *Gene therapy using adenoviral vectors*. Curr Opin Biotechnol, 1994. **5**(6): p. 617-25.
187. Gao, X., K.S. Kim, and D. Liu, *Nonviral gene delivery: what we know and what is next*. Aaps J, 2007. **9**(1): p. E92-104.
188. Csete, M.E., et al., *Adenovirus-mediated gene transfer in the transplant setting. I. Conditions for expression of transferred genes in cold-preserved hepatocytes*. Transplantation, 1994. **57**(10): p. 1502-7.
189. Acsadi, G., B. Massie, and A. Jani, *Adenovirus-mediated gene transfer into striated muscles*. J Mol Med, 1995. **73**(4): p. 165-80.
190. Berkner, K.L., *Development of adenovirus vectors for the expression of heterologous genes*. Biotechniques, 1988. **6**(7): p. 616-29.
191. Schachtner, S.K., et al., *In vivo adenovirus-mediated gene transfer via the pulmonary artery of rats*. Circ Res, 1995. **76**(5): p. 701-9.
192. Mitani, K. and S. Kubo, *Adenovirus as an integrating vector*. Curr Gene Ther, 2002. **2**(2): p. 135-44.
193. Brown, D.T., et al., *Structure and composition of the adenovirus type 2 core*. J Virol, 1975. **16**(2): p. 366-87.

194. Campos, S.K. and M.A. Barry, *Current advances and future challenges in Adenoviral vector biology and targeting*. *Curr Gene Ther*, 2007. **7**(3): p. 189-204.
195. Ghosh, S.S., P. Gopinath, and A. Ramesh, *Adenoviral vectors: a promising tool for gene therapy*. *Appl Biochem Biotechnol*, 2006. **133**(1): p. 9-29.
196. Lonberg-Holm, K. and L. Philipson, *Early events of virus-cell interaction in an adenovirus system*. *J Virol*, 1969. **4**(4): p. 323-38.
197. Svensson, U., *Role of vesicles during adenovirus 2 internalization into HeLa cells*. *J Virol*, 1985. **55**(2): p. 442-9.
198. Lawrence, W.C. and H.S. Ginsberg, *Intracellular uncoating of type 5 adenovirus deoxyribonucleic acid*. *J Virol*, 1967. **1**(5): p. 851-67.
199. Rowe, D.T. and F.L. Graham, *Complementation of adenovirus type 5 host range mutants by adenovirus type 12 in coinfecting HeLa and BHK-21 cells*. *J Virol*, 1981. **38**(1): p. 191-7.
200. McGrory, W.J., D.S. Bautista, and F.L. Graham, *A simple technique for the rescue of early region I mutations into infectious human adenovirus type 5*. *Virology*, 1988. **163**(2): p. 614-7.
201. Fallaux, F.J., et al., *Characterization of 911: a new helper cell line for the titration and propagation of early region 1-deleted adenoviral vectors*. *Hum Gene Ther*, 1996. **7**(2): p. 215-22.
202. Xie, L., et al., *Serum-free suspension cultivation of PER.C6(R) cells and recombinant adenovirus production under different pH conditions*. *Biotechnol Bioeng*, 2002. **80**(5): p. 569-79.
203. Subramanian, S., et al., *Scaleable production of adenoviral vectors by transfection of adherent PER.C6 cells*. *Biotechnol Prog*, 2007. **23**(5): p. 1210-7.
204. Fallaux, F.J., et al., *New helper cells and matched early region 1-deleted adenovirus vectors prevent generation of replication-competent adenoviruses*. *Hum Gene Ther*, 1998. **9**(13): p. 1909-17.
205. Brown, D.T. and B.T. Burlingham, *Penetration of host cell membranes by adenovirus 2*. *J Virol*, 1973. **12**(2): p. 386-96.
206. Svensson, U. and R. Persson, *Entry of adenovirus 2 into HeLa cells*. *J Virol*, 1984. **51**(3): p. 687-94.
207. Varga, M.J., C. Weibull, and E. Everitt, *Infectious entry pathway of adenovirus type 2*. *J Virol*, 1991. **65**(11): p. 6061-70.

208. Nemerow, G.R. and P.L. Stewart, *Role of alpha(v) integrins in adenovirus cell entry and gene delivery*. Microbiol Mol Biol Rev, 1999. **63**(3): p. 725-34.
209. Bergelson, J.M., et al., *Isolation of a common receptor for Coxsackie B viruses and adenoviruses 2 and 5*. Science, 1997. **275**(5304): p. 1320-3.
210. Seidman, M.A., et al., *Variation in adenovirus receptor expression and adenovirus vector-mediated transgene expression at defined stages of the cell cycle*. Mol Ther, 2001. **4**(1): p. 13-21.
211. Coyne, C.B. and J.M. Bergelson, *CAR: a virus receptor within the tight junction*. Adv Drug Deliv Rev, 2005. **57**(6): p. 869-82.
212. Hauwel, M., E. Furon, and P. Gasque, *Molecular and cellular insights into the coxsackie-adenovirus receptor: role in cellular interactions in the stem cell niche*. Brain Res Brain Res Rev, 2005. **48**(2): p. 265-72.
213. David T. Curiel, J.T.D., *Adenoviral Vectors for Gene Therapy 2002*, London, UK: Elsevier Science.
214. Alba, R., A. Bosch, and M. Chillon, *Gutless adenovirus: last-generation adenovirus for gene therapy*. Gene Ther, 2005. **12 Suppl 1**: p. S18-27.
215. Everts, B. and H.G. van der Poel, *Replication-selective oncolytic viruses in the treatment of cancer*. Cancer Gene Ther, 2005. **12**(2): p. 141-61.
216. Mathis, J.M., M.A. Stoff-Khalili, and D.T. Curiel, *Oncolytic adenoviruses - selective retargeting to tumor cells*. Oncogene, 2005. **24**(52): p. 7775-91.
217. Seiler, M.P., V. Cerullo, and B. Lee, *Immune response to helper dependent adenoviral mediated liver gene therapy: challenges and prospects*. Curr Gene Ther, 2007. **7**(5): p. 297-305.
218. Herzog, R.W., et al., *Gene therapy for treatment of inherited haematological disorders*. Expert Opin Biol Ther, 2006. **6**(5): p. 509-22.
219. Mittereder, N., K.L. March, and B.C. Trapnell, *Evaluation of the concentration and bioactivity of adenovirus vectors for gene therapy*. J Virol, 1996. **70**(11): p. 7498-509.
220. Nyberg-Hoffman, C., et al., *Sensitivity and reproducibility in adenoviral infectious titer determination*. Nat Med, 1997. **3**(7): p. 808-11.
221. Roberts, W.G. and G.E. Palade, *Neovasculature induced by vascular endothelial growth factor is fenestrated*. Cancer Res, 1997. **57**(4): p. 765-72.
222. Roberts, W.G. and G.E. Palade, *Increased microvascular permeability and endothelial fenestration induced by vascular endothelial growth factor*. J Cell Sci, 1995. **108 ( Pt 6)**: p. 2369-79.

223. Kawakami, K., et al., *Targeted anticancer immunotoxins and cytotoxic agents with direct killing moieties*. ScientificWorldJournal, 2006. **6**: p. 781-90.
224. Fakhari, M., et al., *Upregulation of vascular endothelial growth factor receptors is associated with advanced neuroblastoma*. J Pediatr Surg, 2002. **37**(4): p. 582-7.
225. Plate, K.H., et al., *Up-regulation of vascular endothelial growth factor and its cognate receptors in a rat glioma model of tumor angiogenesis*. Cancer Res, 1993. **53**(23): p. 5822-7.
226. Bass, C., et al., *Recombinant adenovirus-mediated gene transfer to genitourinary epithelium in vitro and in vivo*. Cancer Gene Ther, 1995. **2**(2): p. 97-104.
227. Pasetto, L.M., et al., *Hepatic metastases of colorectal cancer: locoregional intra-arterial treatment*. Anticancer Res, 2006. **26**(6C): p. 4785-92.
228. Farma, J.M., J.F. Pingpank, and H.R. Alexander, *Isolated hepatic perfusion: treating unresectable liver metastases*. Adv Exp Med Biol, 2006. **574**: p. 1-16.
229. van Etten, B., et al., *Gene therapy in in vivo isolated perfusion models*. Curr Gene Ther, 2005. **5**(2): p. 195-202.
230. Grootenboers, M.J., et al., *Isolated lung perfusion for pulmonary metastases, a review and work in progress*. Perfusion, 2006. **21**(5): p. 267-76.
231. Kim, Y.I., et al., *Intraarterial gene delivery in rabbit hepatic tumors: transfection with nonviral vector by using iodized oil emulsion*. Radiology, 2006. **240**(3): p. 771-7.
232. Shiba, H., et al., *Adenovirus vector-mediated gene transfer using degradable starch microspheres for hepatocellular carcinoma in rats*. J Surg Res, 2006. **133**(2): p. 193-6.
233. Jain, R.K., *Transport of molecules in the tumor interstitium: a review*. Cancer Res, 1987. **47**(12): p. 3039-51.
234. Jain, R.K., *Transport of molecules across tumor vasculature*. Cancer Metastasis Rev, 1987. **6**(4): p. 559-93.
235. Jain, R.K., *Determinants of tumor blood flow: a review*. Cancer Res, 1988. **48**(10): p. 2641-58.
236. Jain, R.K., *Barriers to drug delivery in solid tumors*. Sci Am, 1994. **271**(1): p. 58-65.
237. Fukumura, D. and R.K. Jain, *Tumor microenvironment abnormalities: causes, consequences, and strategies to normalize*. J Cell Biochem, 2007. **101**(4): p. 937-49.
238. Babbs, C.F., et al., *Theoretical feasibility of vasodilator-enhanced local tumor heating*. Eur J Cancer Clin Oncol, 1982. **18**(11): p. 1137-46.

239. Kragh, M., et al., *Acute effects of vascular modifying agents in solid tumors assessed by noninvasive laser Doppler flowmetry and near infrared spectroscopy*. Neoplasia, 2002. **4**(3): p. 263-7.
240. Kitazono, M., et al., *Enhanced adenovirus transgene expression in malignant cells treated with the histone deacetylase inhibitor FR901228*. Cancer Res, 2001. **61**(17): p. 6328-30.
241. Segura-Pacheco, B., et al., *HDAC inhibitor valproic acid upregulates CAR in vitro and in vivo*. Genet Vaccines Ther, 2007. **5**(1): p. 10.
242. Goldsmith, M.E., et al., *The histone deacetylase inhibitor FK228 preferentially enhances adenovirus transgene expression in malignant cells*. Clin Cancer Res, 2003. **9**(14): p. 5394-401.
243. Kitazono, M., et al., *Histone deacetylase inhibitor FR901228 enhances adenovirus infection of hematopoietic cells*. Blood, 2002. **99**(6): p. 2248-51.
244. Fan, S., et al., *Valproic acid enhances gene expression from viral gene transfer vectors*. J Virol Methods, 2005. **125**(1): p. 23-33.
245. Dion, L.D., et al., *Amplification of recombinant adenoviral transgene products occurs by inhibition of histone deacetylase*. Virology, 1997. **231**(2): p. 201-9.
246. Gaetano, C., et al., *Transcriptionally active drugs improve adenovirus vector performance in vitro and in vivo*. Gene Ther, 2000. **7**(19): p. 1624-30.
247. Gonin, P. and C. Gaillard, *Gene transfer vector biodistribution: pivotal safety studies in clinical gene therapy development*. Gene Ther, 2004. **11 Suppl 1**: p. S98-S108.
248. Patterson, D.M. and G.J. Rustin, *Vascular damaging agents*. Clin Oncol (R Coll Radiol). Vol. 19. 2007. 443-56.
249. Kesisis, G., H. Broxterman, and G. Giaccone, *Angiogenesis inhibitors. Drug selectivity and target specificity*. Curr Pharm Des, 2007. **13**(27): p. 2795-809.