



**UNIVERSITAT
ROVIRA i VIRGILI**

**REPTES I NOVES ESTRATÈGIES EN L'ÚS D'ADENOVIRUS
ONCOLÍTICS COM A TERÀPIA CONTRA EL CÀNCER**

Marina Boj Morillo

TREBALL FINAL DE GRAU BIOTECNOLOGIA

Tutora acadèmica: Ana Fernández Bravo, Grau de Biotecnologia, Departament de Ciències Mèdiques Bàsiques, ana.fernandez@urv.cat

Universitat Rovira i Virgili, Tarragona, Setembre de 2024.

Data de convocatòria; Setembre 2024.

Jo, Marina Boj Morillo, amb DNI 39955292Z, soc coneixedor de la guia de prevenció del plagi a la URV Prevenció, detecció i tractament del plagi en la docència: guia per a estudiants (aprovada el juliol 2017) (<http://www.urv.cat/ca/vidacampus/serveis/crai/que-us-oferim/formaciocompetencies-nuclears/plagi/>) i afirmo que aquest TFG no constitueix cap de les conductes considerades com a plagi per la URV.

Tarragona, 26 de Juliol de 2024.

Firmado digitalmente por Marina Boj
Morillo - DNI: 39955292Z el día
26/07/2024.

AGRAÏMENTS

A la meua mare, el meu pare, la Blanca i el Joan, perquè com sempre m'heu animat i donat suport en tot moment. Gràcies per estar al meu costat, tant en els bons moments com quan no veia la llum al final del túnel. La vostra confiança i suport incondicional és el que sempre m'ajuda a tirar endavant i creure que puc aconseguir el que em proposi.

A l'Andreu, la meua parella, gràcies per les teves paraules d'ànim, la teua paciència i el teu suport constant. Has estat un pilar fonamental i has confiat en mi de principi a fi, sempre aconseguint treure'm un somriure en els moments més difícils. Gràcies per ser-hi sempre i per creure en mi.

I finalment, a la Dra Ana Fernández, gràcies pel teu recolzament, per les estones que has dedicat a revisar-me el treball i l'ajuda que he rebut per part teua al ser la meua tutora.

ÍNDIX

ABREVIACIONS	5
RESUM	7
PARAULES CLAU.....	8
1. INTRODUCCIÓ	8
1.1. Viroteràpia oncolítica.....	8
1.2. Adenovirus	10
1.2.1. Estructura	10
1.2.2. Genoma adenoviral	11
1.2.3. Cicle viral de l'adenovirus	12
1.3. Adenovirus oncolítics	15
1.3.1. Obtenció de l'oncoselectivitat	15
1.3.2. Limitacions de la viroteràpia oncolítica amb adenovirus.....	17
2. OBJECTIU.....	19
3. MATERIALS I MÈTODES	19
4. ESTUDIS OBTINGUTS EN LA CERCA	20
5. RESULTATS I DISCUSSIÓ.....	20
5.1. Mecanismes per incrementar la potencia oncolítica.....	21
5.1.1. Modificacions que augmenten l'alliberació de nova progènie viral .	21
5.1.2. Inserció de transgens per a augmentar el potencial oncolíctic	22
5.2. Estratègies per millorar l'oncoselectivitat dels adenovirus	24
5.2.1. Eliminació de gens virals essencials	24
5.2.2. Ús de promotors específics de tumor	24
5.3. Mecanismes per evitar la neutralització d'adenovirus oncolítics per part del sistema immunològic	25
5.3.1. Recobriment amb polímers catiónics.....	25
5.3.2. Ús de micropartícules.....	27

5.3.3. Cèl·lules transportadores	27
5.3.4. Liposomes	29
5.4. Supressió de barreres tumorals	30
5.4.1. Degradació de la matriu extracel·lular	30
5.4.2. Millora de la dispersió intratumoral	30
5.4.3. Modulació de la vasculatura tumoral	31
5.4.4. Superació de la resistència tumoral.....	31
5.5. Combinació amb altres teràpies.....	32
6. CONCLUSIONS	34
7. AUTOAVALUACIÓ.....	35
8. REFERÈNCIES.....	36
ANNEXOS.....	50

ABREVIACIONS

ABP: *Arginine-grafted bioreducible polymer*

ADP: *Adenovirus Death Protein*

AVP: Proteasa adenoviral

BHE: Barrera hematoencefàlica

BiTEs: *Bispecific T-cell Engagers*

CAFs: Fibroblasts associats al càncer

CAR: *Coxsackie and Adenovirus Receptor*

CAR-T: *Chimeric Antigen Receptor T cells*

CD40L: Lligand de CD40

DAMP: Patrons moleculars associats a dany

DBP: Proteïna d'unió a ADN de cadena senzilla

EGFR: Receptor del factor de creixement epidèrmic

FX: Factor X

GM-CSF: Factor estimulant de colònies de granulòcits i macròfags

hAd5: HAdVC de serotipus 5

HSV-I: Virus de l'herpes simple tipus I

HSV-TK: Sistema timidina quinasa del virus de l'herpes simple

hTERT: Transcriptasa inversa de la telomerasa humana

HVR: Regions hipervariables

ICI: Inhibidors de punts de control immunitari

IFN: Interferons

IL: Interleucina

ITRs: Repeticions terminals invertides

MEC: Matriu extracel·lular

mEGF: Factor de creixement epidèrmic murí

MLP: *Major late promoter*

MLTU: *Major late transcription unit*

MP: Micropartícules

MPEG-NH₂: Metoxipolietilenglicol amino

MSC: Cèl·lules mare mesenquimals

NOTCH1: Neurogenic locus notch homolog protein 1

ORF: Seqüència oberta de lectura

PAMP: Patrons moleculars associats a patògens

PBMCs: *Peripheral Blood Mononuclear Cells*

PDAC: Adenocarcinoma ductal pancreàtic

PE: Fosfatidiletanolamina

PEG: Polietilè glicol

pHPMA: Poli-(2-hidroxipropil) metacrilamida

pTP: Proteïna pre-terminal

RSV: Virus sincític respiratori

scFv: *Single-chain variable fragment*

shRNA: *Short hairpin* d'ARN

sTGFβRIIFc: Proteïna de fusió del receptor II soluble del TGFβ

TAA o TSA: Antígens associats o específics de tumors

TCR: *T-cell receptor*

TGF-β: Factor de creixement transformador beta

TNF-α: Factor de necrosi tumoral alfa

TP: Proteïna terminal

T-VEC: Talimogene laherparepvec

VEGF: Factor de creixement endotelial vascular

RESUM

La viroteràpia oncolítica ha mostrat un gran potencial per millorar el tractament del càncer, especialment en tumors difícils de tractar i resistents a les teràpies convencionals, com el càncer de pàncrees. Entre els diferents virus oncolítics avaluats, l'adenovirus és el més estudiat degut al seu elevat perfil de seguretat, l'ampli coneixement genètic i la facilitat de modificació. Tot i així, existeixen certes limitacions que impedeixen la plena eficàcia del tractament, entre elles la falta de selectivitat per les cèl·lules tumorals o la neutralització dels adenovirus per part del sistema immunològic. És per això que es necessita dissenyar diferents estratègies per tal de sobrepassar les limitacions actuals. L'objectiu d'aquest treball consisteix en presentar i revisar els mecanismes que s'han dissenyat els últims anys, per millorar l'eficàcia i especificitat i, així, optimitzar la viroteràpia oncolítica amb adenovirus. Els articles revisats demostren la versatilitat i el potencial dels adenovirus oncolítics, especialment en els casos més letals i resistents a les teràpies convencionals, així com també reflecteixen la gran diversitat d'enfocaments que s'estan explorant avui dia.

ABSTRACT

Oncolytic virotherapy has shown great potential to improve cancer treatment, especially in tumours that are difficult to treat and resistant to conventional therapies, such as pancreatic cancer. Among different oncolytic viruses evaluated, adenovirus is the most studied due to its high safety profile, extensive genetic knowledge and ease of modification. However, there are certain limitations that prevent the full effectiveness of the treatment, including the lack of selectivity for tumour cells or the neutralisation of adenoviruses by the immune system. This is why it is necessary to design different strategies to overcome current limitations. The aim of this work is to present and review the mechanisms that have been designed in recent years to improve the efficacy and specificity, and thus optimise oncolytic virotherapy with adenovirus. Reviewed articles demonstrate the versatility and potential of oncolytic adenoviruses, especially in the most lethal cases resistant to conventional therapies, as well as they reflect the great diversity of approaches that are being explored nowadays.

PARAULES CLAU

“Oncolytic adenovirus”, “oncolytic virotherapy”, “adenovirus”, “neoplasms”, “cancer”, “gene therapy”, “tumour targeting”, “viral vector therapy”.

I. INTRODUCCIÓ

I.1. Viroteràpia oncolítica

La viroteràpia oncolítica és una teràpia que utilitza virus replicatius per a eliminar selectivament les cèl·lules tumorals. Aquests virus, gràcies a la seva oncoselectivitat, són capaços d'infectar i replicar-se en les cèl·lules canceroses, causant la seva lisi sense danyar les cèl·lules sanes (Kelly & Russell, 2007; Figura 1). Durant la lisi cel·lular, s'alliberen molècules com patrons moleculars associats a patògens (PAMP), patrons moleculars associats a dany (DAMP) i antígens associats o específics de tumors (TAA o TSA), a més d'augmentar la producció de citocines i quimiocines com els interferons (IFN) de tipus I, activant així el sistema immunitari i provocant una resposta antitumoral. D'aquesta manera, el virus juga un paper dual, eliminant de forma activa les cèl·lules canceroses i, d'altra banda, activant el sistema immunitari a través de l'alliberació de molècules després de la lisi (Lin et al., 2023).

Aquesta lisi cel·lular indueix una mort cel·lular immunogènica, en la qual les cèl·lules alliberen molècules que activen les cèl·lules dendrítiques per a iniciar una resposta immune (Galluzzi et al., 2023), permetent també atacar focus metastàtics inaccessibles pel virus. Per tant, els virus poden convertir tumors “freds” en “calents”, augmentant la infiltració de cèl·lules T efectores (Kelly & Russell, 2007; Lin et al., 2023).

Alguns virus, com el reovirus, tenen oncoselectivitat natural (Kelly & Russell, 2007) i es repliquen preferentment en cèl·lules transformades, mostrant resultats prometedors en assajos clínics per a varis tipus de càncer, inclòs l'adenocarcinoma ductal pancreàtic (PDAC) (Mahalingam et al., 2018; Villalona-Calero et al., 2016). Altres virus, sense aquesta selectivitat natural, han de ser modificats genèticament per a evitar la seva replicació en cèl·lules sanes i millorar la seva seguretat i eficàcia oncolítica. Aquestes modificacions solen incloure transgens per a potenciar la resposta antitumoral, ja que l'efecte oncolíctic

per si sol no és suficient per a eliminar completament el tumor (Hamdan et al., 2023).

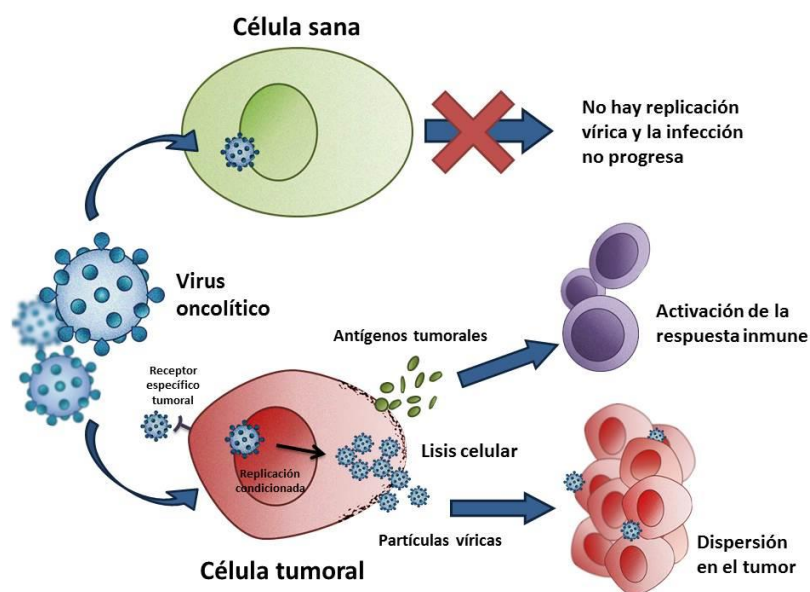


FIGURA 1. ONCOSELECTIVAT I MECANISMES D'ACCIÓ ANTITUMORAL DELS VIRUS ONCOLÍTICS (VIRUS ONCOLÍTICS: UN NUEVO ALIADO EN LA LUCHA CONTRA EL CÁNCER | SEBBM, N.D.).

Actualment, existeixen tres virus oncolítics aprovats comercialment. El primer, H101, és un adenovirus humà serotipus 5 aprovat a Xina el 2005 per a tractar el carcinoma nasofaríngi en combinació amb quimioteràpia. Presenta una deleció en el gen E1B-55 que li atorga oncoselectivitat (Liang, 2018). El segon, Talimogene laherparepvec (T-VEC), basat en el virus de l'herpes simple tipus I (HSV-I), va ser aprovat per la FDA el 2015 per al tractament intratumoral del melanoma no ressecable (Andtbacka et al., 2016). T-VEC està modificat per a induir una forta resposta immune. El tercer, Teserpaturev, també basat en el HSV-I, va ser aprovat al Japó el 2021 per a tractar gliomes malignes (Frampton, 2022).

Tot i els prometedors resultats d'aquests virus, encara seria necessària augmentar l'eficàcia del tractament per a què pugui ser utilitzat com a monoteràpia. Per això, molts assajos clínics combinen aquests virus amb altres tractaments (Shalhout et al., 2023), com inhibidors de punts de control immunitari (ICI), i alguns virus estan sent modificats amb transgens immunomoduladors per a millorar la seva efectivitat (Hamdan et al., 2023). Entre els diferents virus oncolítics avaluats, l'adenovirus és el més estudiat degut al seu elevat perfil de

seguretat, l'ampli coneixement genètic i la facilitat de modificació (Kaufman et al., 2015; K. Li et al., 2022).

I.2. Adenovirus

Els adenovirus són virus d'ADN bicatenari amb una càpsida icosaèdrica de 90-100 nm de diàmetre, aïllats per primer cop el 1953 (Rowe et al., 1953). Són comuns al medi ambient i generalment causen infeccions asimptomàtiques en adults immunocompetents, encara que en nens poden provocar símptomes lleus, principalment respiratoris (Khanal et al., 2018). Existeixen set espècies d'adenovirus capaces d'infectar humans, totes del gènere Mastadenovirus (HAdVA-HAdVG), sent els serotipus 2 i 5 de l'espècie HAdVC, els més estudiats i clínicament rellevants. El serotipus HAdVC-5 (hAd5) és el principal enfoc d'estudi en el camp de la viroteràpia (Dhingra et al., 2019).

I.2.1. Estructura

El viriò de l'adenovirus mesura aproximadament 90 nm i presenta una estructura icosaèdrica composta per 14 proteïnes diferents. La càpsida està formada per 252 capsòmers: 240 hexons i 12 pentons, amb hexons en les cares i pentons en els vèrtexs. Els hexons són proteïnes trimèriques (proteïna II), mentre que els pentons estan formats per una base pentamèrica (proteïna III) i una fibra trimèrica (proteïna IV) que sobresurt de la base. A més, hi ha proteïnes de cimentació (IIIa, VI, VIII i IX) que reforcen les interaccions entre capsòmers. El nucli viral, no icosaèdric, està protegit per aquesta càpsida i conté l'ADN associat a cinc proteïnes diferents (V, VII, mu, IVa2 i PT) i la proteasa adenoviral (AVP) (Gallardo et al., 2021; Stewart, 2016).

L'hexó és la proteïna més abundant, amb 720 monòmers en total, i amb una base hexagonal que encaixa perfectament amb altres capsòmers. La part superior de la proteïna és trimèrica, amb tres "torres" formades per bucles de polipèptids, on es troben les regions hipervariables (HVR), regions molt poc conservades entre les diferents espècies d'adenovirus (Gallardo et al., 2021). La flexibilitat i tolerància de seqüència d'aquests bucles hipervariables els fa útils com a llocs d'inserció per a la modificació de la càpsida de l'adenovirus (Wu et al., 2005).

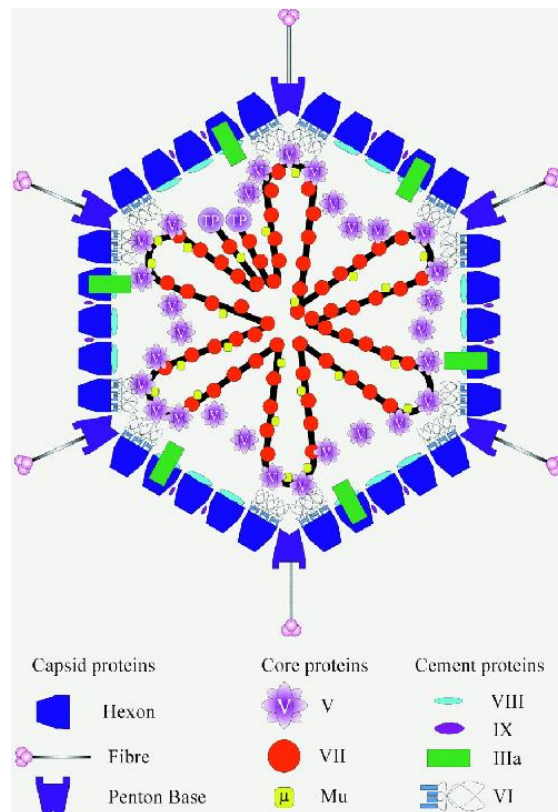


FIGURA 2. ESTRUCTURA D'UN VIRIÓ ADENOVIRAL (RUSSELL, 2000).

1.2.2. Genoma adenoviral

El genoma adenoviral té una extensió d'entre 25 i 45 kb, sent el del hAd5 de 36 kb. En ambdós extrems del genoma, es troben repeticions terminals invertides (ITRs) de 100 pb i una seqüència d'empaquetament (ψ) junt a la ITR esquerra, necessària per a l'empaquetament del genoma a l'interior de la càpsida. D'altra banda, la proteïna terminal (TP) es troba unida a ambdós extrems 5' del genoma a través d'una unió covalent (Davison et al., 2003).

El seu genoma, amb una elevada densitat de seqüències codificants superposades en ambdues cadenes, conté unitats transcripcionals policistròniques; és a dir, que una única unitat transcripcional codifica per a més d'una proteïna. Mitjançant mecanismes d'*splicing* alternatiu de l'ARN, els adenovirus humans són capaços de codificar unes 40 proteïnes en un genoma relativament petit (Davison et al., 2003).

L'expressió dels gens del virus està regulada temporalment per tal de reprogramar la cèl·lula de forma gradual, i així aprofitar al màxim la seva maquinària i dirigir la producció viral. Per aquest motiu, el genoma adenoviral

està organitzat en unitats transcripcionals expressades en diferents moments temporals molt ben delimitats (Nemerow & Flint, 2019):

- Immediatament primerenca (*Immediate early*): E1A. S'expressa immediatament després de l'entrada del genoma viral al nucli i inicia l'expressió de la resta d'unitats transcripcionals.
- Primerenques (*Early*): E1B, E2, E3 i E4.
- Intermèdies (*Intermediate o delayed early*): codifiquen per a les proteïnes IX i IVa2.
- Tardanes (*Late*): un únic pre-ARNm controlat pel *major late promoter* (MLP) que genera cinc famílies d'ARNm (L1-L5), codificants per a proteïnes de la càpsida viral, per mitjà d'*splicing* alternatiu.

A més, el genoma inclou dos petits transcrits no codificants, VA ARN-I i VA ARN-II, transcrits per a l'ARN polimerasa III.

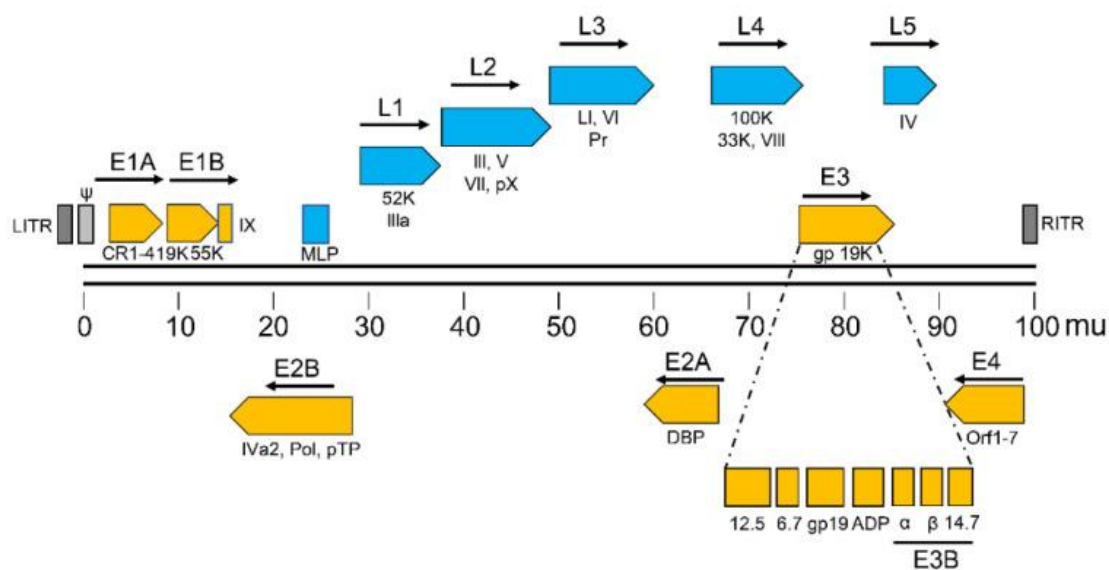


FIGURA 3. GENOMA ADENOVIRAL I LES SEVES UNITATS TRANSCRIPCIONALS (WATANABE ET AL., 2021).

1.2.3. Cicle viral de l'adenovirus

Els adenovirus tenen un cicle viral lític. Després d'entrar a la cèl·lula, el virus es desensambla i el seu ADN és transportat al nucli, on la proteïna E1A inicia la fase primerenca, prenent el control de la maquinària cel·lular per a replicar l'ADN viral. A continuació, les proteïnes intermèdies donen lloc a la fase tardana, produint les proteïnes necessàries per ensamblar noves càpsides virals i empaquetar el genoma. Eventualment, les noves partícules virals causen la lisi cel·lular, sent

així alliberades per a infectar més cèl·lules. Tot el cicle dura al voltant de 36 h (Källsten et al., 2017; Watanabe et al., 2021; Figura 4).

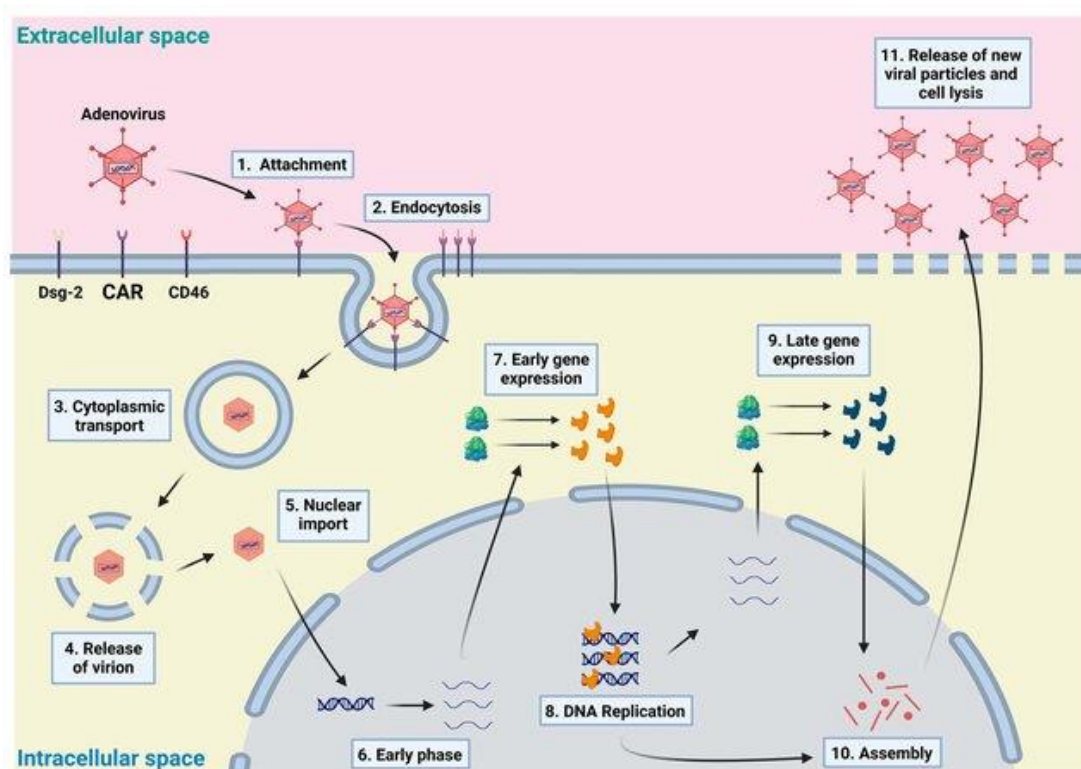


FIGURA 4. ESQUEMA DEL CICLE DE REPLICACIÓ ADENOVIRAL (SCARSELLA ET AL., 2024).

Internalització del virus

L'entrada de l'adenovirus a la cèl·lula s'inicia amb la unió al receptor CAR (*Coxsackie and Adenovirus Receptor*) (Bergelson et al., 1997), el qual s'expressa a baixes concentracions en alguns càncers (Y. Zhang & Bergelson, 2005), o la unió a altres receptors com l'heparan sulfat (Dehecchi et al., 2000). Aquesta ve seguida d'una segona interacció de la proteïna de la base del pentó amb integrines cel·lulars (Wickham et al., 1993). A continuació, té lloc l'endocitosis del virus mediada per clatrina i el desensamblatge progressiu de la càpsida viral dins de l'endosoma (Meier & Greber, 2004; Wolfrum & Greber, 2013). La proteïna VI del virus facilita l'alliberació de l'ADN viral al citoplasma (Wiethoff et al., 2005), que és transportat al nucli a través de microtúbuls, utilitzant el complex dineïna-dinactina (Leopold et al., 2000). D'altra banda, la proteïna VII associada a l'ADN viral permet que aquest pugui ser importat a través del complex del porus nuclear sense activar mecanismes de resposta al dany en l'ADN (Greber et al., 1997; Karen & Hearing, 2011).

Expressió de les proteïnes primerenques

Al nucli, l'ADN viral es descompacta i es transcriuen els gens d'expressió primerenca. Les seves funcions principals són: induir l'entrada de la cèl·lula en fase S, suprimir la resposta immunitària antiviral i facilitar la replicació de l'ADN viral.

E1A és la primera proteïna a ser expressada degut que únicament necessita elements de la pròpia cèl·lula per expressar-se i regula la transcripció dels gens virals primerencs (Berk, 2005). E1A pot unir-se a pRb, alliberant així el factor de transcripció E2F del complex amb pRb, el qual estava reprimint la seva funció. Al seu torn, E2F pot activar la transcripció d'altres gens virals primerencs que presentin caixes de resposta a E2F en els seus promotors. D'altra banda, l'alliberació d'E2F fa que la cèl·lula avanci a fase S promovent la proliferació cel·lular (DeCaprio, 2009).

Les proteïnes E1B inhibeixen l'apoptosi, assegurant un entorn favorable per a la replicació viral gràcies a la inhibició de proteïnes com la p53 (Savelyeva & Dobbstein, 2011). La unitat transcripcional E2 codifica per a proteïnes que faciliten la replicació de l'ADN viral: la polimerasa d'ADN, la proteïna pre-terminal (pTP) i la proteïna d'unió a ADN de cadena senzilla (DBP) (Hoeben & Uil, 2013). D'altra banda, E3 modula la resposta immune i l'apoptosi a través de diferents mecanismes, com ara bloquejant la presentació d'antígens o induint la degradació de receptors pro-apoptòtics (Lichtenstein et al., 2004).

Expressió de les proteïnes tardanes

A mesura que progressa el cicle viral, té lloc un canvi de la transcripció dels gens primerencs als tardans, i MLP, que des de les fases inicials de la infecció presenta un nivell transcripcional basal, passa a estar completament activat. La transcripció de gens d'expressió tardana és activada per la replicació de l'ADN viral i la presència de la proteïna IVa2, que juntament amb la proteïna L4-22K són les encarregades d'activar MLP. L'expressió del MLP dona lloc a una única unitat de transcripció d'ARNm, MLTU (*major late transcription unit*), que produeix cinc grups d'ARNm madurs (L1, L2, L3, L4 i L5) per mitjà d'*splicing* alternatiu. Aquests codifiquen principalment proteïnes estructurals de la càpsida viral (Akusjarvi, 2008). La proteïna L4-100K és la primera proteïna viral tardana

sintetitzada, la qual millora la traducció d'ARNm tardans i suprimeix la síntesi de proteïnes cel·lulars (Xi et al., 2005).

Ensamblatge, empaquetament i alliberació dels nous virions

L'ensamblatge de noves càpsides virals té lloc al nucli, on les proteïnes estructurals sintetitzades en el citoplasma s'importen per a formar virions (Wodrich et al., 2003). Proteïnes virals com la IVa2 i la L4-22K faciliten l'empaquetament del genoma viral en càpsides immadures interactuant amb la seqüència d'empaquetament (Yang & Maluf, 2012). A continuació, la proteasa viral processa les proteïnes precursors per a formar els virions madurs i infectius (Ahi & Mittal, 2016).

Finalment, la proteïna E3-11.6K ADP (*Adenovirus Death Protein*), codificada en la regió E3, promou la lisi cel·lular, alliberant els nous virions (Tollefson et al., 1996). L'eficiència de producció viral permet que una cèl·lula infectada pugui produir entre 10.000 i un milió de còpies d'ADN viral en aproximadament 40 hores (Hoeben & Uil, 2013).

I.3. Adenovirus oncolítics

Els adenovirus han demostrat ser excel·lents candidats com a virus oncolítics per a la seva aplicació clínica degut al seu alt perfil de seguretat, la capacitat de transduir cèl·lules en divisió i quiescents, l'ampli coneixement del seu genoma, el baix nivell d'integració genòmica, la facilitat de producció a gran escala i de poder editar-los genèticament. A més, són altament immunogènics, ja que la lisi cel·lular mediada per adenovirus allibera molècules com DAMPs, PAMPs i antígens tumorals, que activen les cèl·lules dendrítiques en el microambient tumoral, iniciant així una resposta immune antitumoral (Farrera-Sal et al., 2021).

I.3.1. Obtenció de l'oncoselectivitat

Els adenovirus no són capaços de distingir entre cèl·lules sanes i tumorals de forma natural; és a dir, no posseeixen oncoselectivitat. Per tal d'adquirir aquesta característica, han de ser modificats genèticament. S'han desenvolupat diverses estratègies per evitar que els adenovirus oncolítics ataquin les cèl·lules sanes, com ara la modificació del seu tropisme (*detargeting* i *retargeting*), el control de l'expressió de gens virals i la supressió de funcions de proteïnes virals (Alemany, 2016; Mantwill et al., 2021).

Modificació del tropisme adenoviral – *detargeting/retargeting*

La modificació del tropisme adenoviral es basa en alterar les proteïnes de la càpsida viral per evitar interaccions amb receptors naturals (*detargeting*) i/o redirigir-les de forma activa cap a cèl·lules tumorals (*retargeting*) (Barry et al., 2020). Entre aquestes estratègies, estudiades durant dècades, s'inclou l'ablació del domini d'unió de la fibra amb el receptor CAR (Alemany & Curiel, 2001), la substitució de la fibra amb la d'altres serotipus (Kanerva et al., 2002) i la inserció de pèptids (Kaliberov et al., 2016), anticossos (Van Erp et al., 2015) o molècules adaptadores en les proteïnes de la càpsida. Una destacada modificació és l'addició del motiu RGD, d'unió a integrines, que permet l'entrada a la cèl·lula de forma independent de CAR a través d'integrines, freqüentment sobreexpressades en tumors. Aquesta addició millora la transducció i biodisponibilitat del virus en tumors (Kanerva et al., 2002; J. J. Rojas et al., 2012). Tot i així, aquestes estratègies no són suficients per a evitar la transducció de cèl·lules sanes, amb la qual cosa han de combinar-se amb altres sistemes per aconseguir l'oncoselectivitat.

Control de l'expressió dels gens virals

En adenovirus oncolítics, es pot aconseguir l'oncoselectivitat únicament modificant el patró d'expressió de la unitat transcripcional E1A, ja que controla l'expressió de tot el genoma viral. Substituir el promotor d'E1A per un d'específic de tumor és una estratègia comú (Peter & Kühnel, 2020). Exemples de promotors utilitzats són el del gen DF3/MUC1 (Kurihara et al., 2000), el del factor E2F-1 (Hemminki et al., 2015), el de la telomerasa (hTERT) (Irving et al., 2004), i el del gen uPAR (Huch et al., 2009). També s'utilitzen promotors híbrids que reaccionen a condicions d'hipòxia en tumors (Y. Li et al., 2018). A més, l'expressió del promotor pot augmentar-se amb seqüències de resposta a vies de senyalització com Notch (Mato-Berciano et al., 2017), o amb seqüències de reconeixement de factors de transcripció com E2F, que actuen diferentment en cèl·lules sanes i tumorals (J. J. Rojas et al., 2010).

Supressió de funcions de les proteïnes virals

Aquesta modificació implica l'eliminació parcial o total de proteïnes virals per a interferir en la seva replicació i control cel·lular. Els adenovirus necessiten induir la fase S en la cèl·lula hoste, inhibint les proteïnes pRb i p53, procés redundant

en molts tumors. A l'eliminar els mecanismes d'inhibició d'aquestes proteïnes en el virus, només és possible la replicació del virus en cèl·lules tumorals.

La regió CR2 d'E1A, que interactua amb pRb, pot ser modificada (E1A- Δ 24) per tal d'impedir aquesta interacció i la conseqüent alliberació d'E2F (J. J. Rojas et al., 2009). Tot i així, aquesta modificació no és completament selectiva ja que altres regions i proteïnes virals també activen el cicle cel·lular.

La proteïna E1B-55K degrada p53 per a prevenir l'apoptosi induïda per E1A. L'adenovirus ONYX-015 conté una mutació a E1B-55K que impedeix la unió amb p53, i inicialment es va creure que conferia oncoselectivitat (Bischoff et al., 1996). Més tard, va descobrir-se que aquesta selectivitat era deguda a una exportació diferencial dels ARNm virals entre cèl·lules sanes i tumorals (O'Shea et al., 2004).

I.3.2. Limitacions de la viroteràpia oncolítica amb adenovirus

Tot i que l'ús d'adenovirus en viroteràpia oncolítica ha demostrat ser molt prometedora, encara existeixen diverses limitacions que han de ser superades.

Absència de models preclínic immunocompetents permissius a la replicació adenoviral

Un aspecte crucial per a avaluar una nova teràpia és comptar amb models animals adequats (McKenna et al., 2020). La majoria dels estudis sobre l'eficàcia dels adenovirus oncolítics utilitzen ratolins immunodeficients (NSG o *nude*), que permeten la implantació de tumors humans. Tot i així, aquests models només ofereixen una avaluació parcial de l'eficàcia antitumoral, ja que no permeten observar adequadament els efectes de la resposta immunitària. La falta d'estudis en ratolins immunocompetents es deu a que les cèl·lules murines són poc permissives a la infecció amb l'adenovirus 5 humà (Bertzbach et al., 2021).

Una alternativa és l'ús de models de ratolins humanitzats, on ratolins immunodeficients són injectats amb PBMCs (*Peripheral Blood Mononuclear Cells*) o cèl·lules mare hematopoètiques per a reconstituir un sistema immunològic humà (Carrillo et al., 2018). Aquests models són complexos, requereixen més temps i, en algunes estratègies, les cèl·lules es mantenen durant poc temps en l'animal. Un altre model utilitzat és el hamster siri, que es semi-permissiu a la replicació adenoviral i ha demostrat l'eficàcia antitumoral

d'alguns adenovirus oncolítics (Wold & Toth, 2012). No obstant, el seu ús està limitat per la disponibilitat de reactius per a estudiar paràmetres immunològics i el reduït nombre de línies cel·lulars disponibles (McKenna et al., 2020).

Trobar un model murí permissiu a la replicació adenoviral seria de gran interès, ja que permetria estudiar tant l'efecte oncolíctic del virus en el tumor com l'efecte antiviral i antitumoral del sistema immunitari de l'hoste.

Limitacions en l'administració sistèmica de les teràpies basades en adenovirus

La via d'administració d'una teràpia és un altre factor important a tenir en compte. Molts assajos clínics utilitzen la via intratumoral, que encara que garanteix l'arribada del virus al tumor, no resulta eficaç per a tractar metàstasis avançades (Farrera-Sal et al., 2021). L'elevada pressió intersticial pot dificultar la dispersió del virus i facilitar l'aparició de metàstasis. L'administració sistèmica, tot i que sembla ser prometedora, presenta limitacions com la necessitat d'una major quantitat de preparació viral, la interacció amb proteïnes circulants, el seu segrest pel sistema reticuloendotelial i macròfags esplènics, i la limitada permeabilitat dels vasos tumorals.

Al torrent sanguini, l'adenovirus interactua amb factors de coagulació, principalment el factor X (FX), que facilita la transducció hepàtica (Parker et al., 2006). El virus s'internalitza al fetge a través de receptors *scavenger* i cèl·lules de *Kupffer* (Xu et al., 2008). De fet, en ratolins, el 98% del virus administrat és segrestat pel fetge (Alemany et al., 2000). L'adenovirus també interactua amb plaquetes i eritròcits, tot i que en humans aquesta unió és reversible i no redueix la transducció als teixits (L. A. Rojas et al., 2016).

Un altre repte important a sobrepassar és la immunitat preexistent contra l'adenovirus degut a exposicions prèvies, amb alts percentatges d'anticossos neutralitzants, especialment contra l'hAd5 (Allen & Byrnes, 2019). Això limita l'administració repetida necessària per a un efecte terapèutic.

Diverses estratègies busquen protegir i emmascarar els adenovirus oncolítics en circulació per tal d'incrementar la seva eficàcia i el títol viral que arriba al tumor.

2. OBJECTIU

Presentar i revisar les diferents estratègies que s'han dissenyat en els últims anys, per millorar l'eficàcia i optimitzar la viroteràpia oncolítica amb adenovirus.

3. MATERIALS I MÈTODES

Es va realitzar una cerca sistemàtica tant de literatura original com de revisió per a publicacions en anglès d'entre els anys 2014 i 2024. La cerca es va dur a terme en la base de dades del PubMed sobre noves tècniques o estratègies per sobrepassar els reptes i limitacions actuals en l'ús d'adenovirus oncolítics pel tractament del càncer. Es van utilitzar les següents paraules clau: "oncolytic adenovirus", "oncolytic virotherapy", "adenovirus", "neoplasms", "cancer", "gene therapy", "tumour targeting", "viral vector therapy".

Els criteris d'inclusió de la cerca bibliogràfica van ser que el tema principal dels articles fos l'ús d'adenovirus salvatges o modificats utilitzats pel tractament del càncer, que les tècniques utilitzades fossin innovadores i permetessin sobrepassar limitacions trobades fins ara en assajos amb adenovirus oncolítics, i que aquestes noves estratègies siguin capaces d'incrementar el potencial oncolític o bé eludir el sistema immunològic abans que el virus arribi al tumor. Com a criteri d'exclusió es va tindre en compte la data de publicació de la literatura, de manera que aquells articles publicats abans del 2014 van ser descartats. Excepcionalment, estudis anteriors al 2014, presentats en les revisions consultades i que han suposat avenços i millores en el camp de la viroteràpia oncolítica amb adenovirus, també han estat inclosos a posteriori en aquest treball.

4. ESTUDIS OBTINGUTS EN LA CERCA

Utilitzant les paraules clau mencionades anteriorment, es van trobar 548 articles en la base de dades del PubMed, dels quals se'n van eliminar 316 per ser anteriors a l'any 2014 i 62 perquè no estaven disponibles de forma gratuïta. Aquest treball compta amb un total de 167 estudis consultats, 136 dels quals són estudis preclínic, 3 assajos clínics, 27 revisions i 1 revisió sistemàtica. Es tracten d'articles publicats originalment en anglès (excepte 2), realitzats en diverses parts del món i que utilitzaven diferents estratègies per optimitzar i sobrepassar les limitacions que comporta l'ús d'adenovirus oncolítics. La Figura 5 mostra el diagrama de flux dels articles resultants de la cerca que s'han consultat per a la realització del treball.

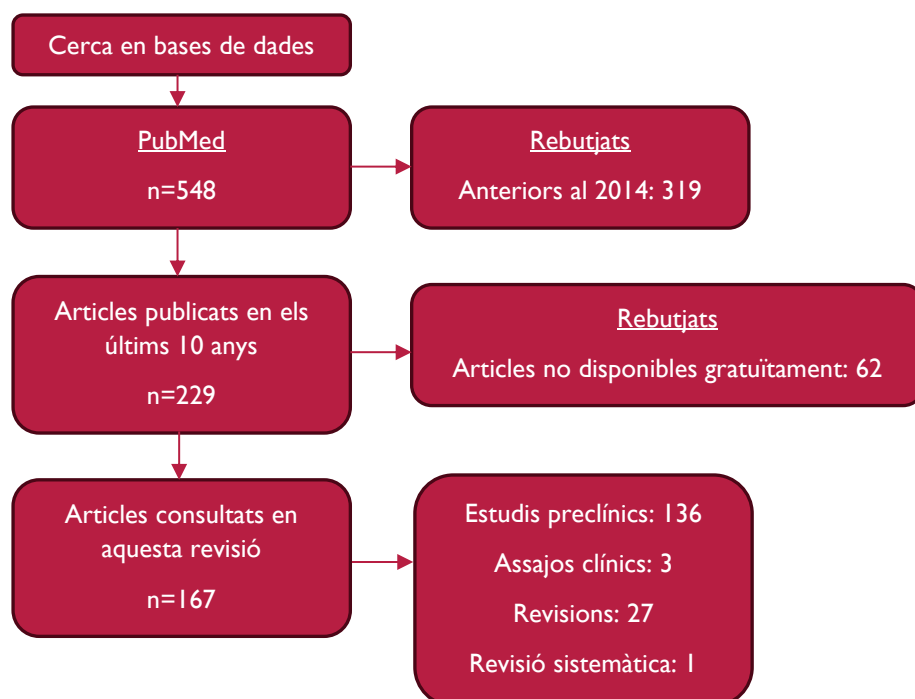


FIGURA 5. DIAGRAMA DE FLUX DE LA CERCA.

5. RESULTATS I DISCUSSIÓ

La implementació de modificacions genètiques, combinacions terapèutiques, vectors de lliurament millorats, estratègies per superar les barreres tumorals, millora de la selectivitat per cèl·lules tumorals i optimització de la resposta immune són aspectes claus per augmentar l'èxit de la viroteràpia oncolítica amb adenovirus. Aquestes estratègies han demostrat un potencial significatiu per

millorar l'eficàcia dels adenovirus oncolítics en el tractament de diversos tipus de càncer, com el càncer de pàncrees, un dels càncers més letals i resistents a les teràpies convencionals, oferint noves vies per a una teràpia més efectiva i específica.

5.1. Mecanismes per incrementar la potencia oncolítica

Un dels avantatges de la viroteràpia oncolítica és la capacitat de modificar genèticament els virus per millorar la seva funció antitumoral. S'han realitzat alteracions que augmenten l'alliberament de nova progènie viral, o la inserció de transgens que proporcionen beneficis per a l'eliminació total del tumor.

5.1.1. Modificacions que augmenten l'alliberació de nova progènie viral

Entre les modificacions que han demostrat ser capaces d'augmentar i accelerar l'alliberament de noves partícules virals es troben: mutacions en la proteïna V (Freudenberger et al., 2018), que afavoreixen la replicació de l'ADN viral; mutacions en l'*i-leader* (Puig-Saus et al., 2012; Van Den Hengel et al., 2011) o la sobreexpressió d'ADP (Gros, 2013).

Freudenberger et al. (2018) han demostrat com la proteïna V del nucli de l'adenovirus humà és una diana de la maquinària de SUMOilació de l'hoste, que pot limitar les funcions virals essencials. Els autors van descobrir que la SUMOilació de la proteïna V afecta negativament la replicació de l'ADN viral i la formació de nous virus. Mitjançant experiments de mutació i anàlisi funcional, van mostrar que mutacions en la proteïna V que eviten la SUMOilació augmenten l'eficiència de la replicació viral i l'alliberament de noves partícules víriques, suggerint que la maquinària de SUMOilació de l'hoste actua com una barrera antiviral natural. Aquest estudi pot donar lloc a noves estratègies terapèutiques basades en la modulació de la SUMOilació.

Els estudis de Van Den Hengel et al. (2011) i Puig-Saus et al. (2012) mostren que la truncació de la seqüència oberta de lectura (ORF) del *i-leader* en l'hAd5 augmenta significativament l'alliberament de noves partícules virals en cèl·lules de glioma en el primer estudi i, permet evitar els fibroblasts associats al càncer (CAFs) i les barreres estromals del tumor en el segon, facilitant la propagació del virus dins del tumor. Aquests articles ressalten la importància d'adaptar els vectors virals per tal de superar les defenses del microambient tumoral.

L'article de Gros i Guedan (2013) discuteix la importància de l'alliberament dels adenovirus de les cèl·lules infectades com un factor clau per a l'oncolisi adenoviral. La sobreexpressió d'ADP, també coneguda com a proteïna E3-11.6K, ha demostrat augmentar significativament la lisi de les cèl·lules tumorals i accelerar l'alliberament de partícules virals. Això és especialment important en la viroteràpia oncolítica, ja que una ràpida i eficient disseminació del virus pot destruir de manera més efectiva les cèl·lules tumorals.

5.1.2. Inserció de transgens per a augmentar el potencial oncolític

Una de les estratègies més utilitzades per augmentar l'activitat oncolítica dels adenovirus és la inserció de transgens, estratègia coneguda com a "armament" dels adenovirus. Aquests transgens poden ser de tipus virocèntric, que generen proteïnes citotòxiques que ajuden a eliminar les cèl·lules infectades o a millorar la propagació del virus dins del tumor, o de tipus immunocèntric, que produeixen proteïnes que modulen el sistema immunitari (Nattress & Halldén, 2018). Diverses proteïnes han estat utilitzades per potenciar l'acció citotòxica dels adenovirus, com ara sistemes prodroga-enzim, toxines, inductors d'apoptosi o proteïnes fusogèniques.

El sistema prodroga-enzim es basa en transgens que codifiquen enzims capaços de convertir una prodroga en un metabòlit citotòxic. Aquest sistema permet una expressió selectiva del transgen a les cèl·lules tumorals, la qual cosa facilita la conversió controlada de la prodroga i l'expansió de l'efecte citotòxic a les cèl·lules veïnes (Zhang et al., 2015). Un dels exemples més destacats i efectius d'aquesta estratègia és el sistema timidina quinasa del virus de l'herpes simple (HSV-TK). Aquest sistema consisteix en la inserció del gen HSV-TK en l'adenovirus, de manera que quan el pacient rep la prodroga ganciclovir, aquesta és convertida en un agent tòxic per la timidina quinasa només en les cèl·lules infectades pel virus; és a dir, les cèl·lules tumorals, provocant la seva mort. A més, el ganciclovir presenta un efecte colateral sobre les cèl·lules adjacents, ampliant així el seu efecte terapèutic (Yoon et al., 2023; Zhang et al., 2019).

Recentment, amb l'aprovació del T-VEC, l'ús de transgens ha evolucionat cap a la potenciació de la resposta immune provocada per la lisi viral en lloc de només maximitzar la lisi cel·lular. Així, molts adenovirus s'han modificat per expressar transgens que codifiquen per proteïnes immunomoduladores, que estimulen el

sistema immunològic, com el factor estimulant de colònies de granulòcits i macròfags (GM-CSF) (Oh et al., 2017; Ranki et al., 2016), el lligand de CD40 (CD40L) (Zafar et al., 2018), la interleucina 12 (IL-12) (Poutou et al., 2015) o l'IFN (Shinoda et al., 2023).

Un exemple és el GM-CSF, una citocina que promou la producció i l'activació de cèl·lules dendrítiques, millorant així la presentació d'antígens. L'expressió de GM-CSF pels adenovirus oncolítics va resultar en una resposta immune més forta i localitzada contra el tumor, fet que va conduir a una major infiltració de cèl·lules immunitàries al tumor i, consegüentment, a una destrucció més eficient de les cèl·lules canceroses (Oh et al., 2017; Ranki et al., 2016). D'aquesta manera es pot incrementar l'eficàcia del tractament, no només destruint les cèl·lules infectades pel virus sinó també estimulando una resposta immune més àmplia contra el tumor (Yoon et al., 2023). Aquest enfoc va resultar ser especialment efectiu en models preclínic de càncer de pàncrees, mostrant una reducció significativa del creixement tumoral (Zhang et al., 2022).

També en models animals de sarcoma, l'adenovirus que expressava GM-CSF va induir una forta resposta immune localitzada, que va ser capaç de superar alguns dels mecanismes d'evasió immunitària del tumor. Això va resultar en una reducció significativa del volum tumoral, suggerint que aquesta estratègia podria ser una eina potent per millorar l'eficàcia dels tractaments oncolítics en pacients humans (Bramante et al., 2014).

Una altra opció és "armar" els virus amb BiTEs (*Bispecific T-cell Engagers*) per tal de reclutar cèl·lules T i atacar les cèl·lules canceroses. Els BiTEs són fragments variables monocatenaris d'anticossos disposats en tàndem (scFv) dissenyats per unir-se simultàniament a la subunitat *T-cell receptor* (TCR)-CD3 ϵ de les cèl·lules T i a un antigen de superfície associat a tumors (TAA). Aquesta interacció condueix a la formació de sinapsis immunològiques i, consegüentment, l'activació de les cèl·lules T, tant CD4 com CD8, per atacar les cèl·lules tumorals (Basnet et al., 2022; De Sostoa et al., 2019; Freedman et al., 2017).

La clau per a l'èxit de la teràpia depèn del moment i la quantitat d'expressió del transgen. Factors com la mida del transgen, el promotor que controla la seva expressió i l'element que permet la traducció (com un IRES o un pèptid *linker*

d'auto-escissió 2A) són crucials (Farrera-Sal et al., 2020). A més, per maximitzar l'expressió del transgen, la seva seqüència pot ser optimitzada per ajustar-se als codons humans. No obstant això, recentment s'ha observat que una optimització excessiva del transgen pot ser perjudicial per al *fitness* viral quan el transgen està sota el control del MLP (el promotor més fort del virus), provocant competència amb les proteïnes virals tardanes. Per tant, els transgens menys optimitzats podrien ser millor tolerats en aquestes condicions (Núñez-Manchón et al., 2021).

5.2. Estratègies per millorar l'oncoselectivitat dels adenovirus

5.2.1. Eliminació de gens virals essencials

Una estratègia clau per augmentar l'oncoselectivitat consisteix en eliminar gens virals essencials per a la replicació en cèl·lules sanes però no en cèl·lules tumorals, com ara els gens E1A i E1B. L'eliminació d'aquests gens permet que la replicació viral sigui exclusiva en cèl·lules canceroses, ja que les vies de replicació alterades en aquestes cèl·lules compensen l'absència dels gens eliminats. Per exemple, els adenovirus amb delecions en el gen E1B-55kDa poden replicar-se només en cèl·lules en què la via de p53 és defectuosa, una característica comuna en molts tumors, com ara el càncer de pàncrees (Lee et al., 2020; Nattress & Halldén, 2018). D'aquesta manera, s'augmenta la seguretat i l'eficàcia de la teràpia a l'evitar la replicació no desitjada del virus en teixits sans, reduint així els efectes secundaris (Yoon et al., 2023).

5.2.2. Ús de promotors específics de tumor

L'ús de promotors específics de càncer assegura que els transgens s'expressin exclusivament en les cèl·lules tumorals, evitant danys a les cèl·lules sanes. Això permet una teràpia més dirigida i segura (Mantwill et al., 2021; Nattress & Halldén, 2018). Alguns exemples de promotors específics de càncer són DF3/MUC1 i el de la transcriptasa inversa de la telomerasa humana (hTERT). Doloff i Waxman (2011) van dissenyar un adenovirus oncolític per atacar tumors heterogenis utilitzant aquests dos promotors específics de càncer. hTERT és un promotor actiu en moltes cèl·lules canceroses degut que regula l'expressió de la telomerasa, un enzim associat a la immortalitat de les cèl·lules tumorals. Aquest permet allargar els telòmers de les cèl·lules, conseqüentment augmentant la

seva vida útil. D'aquesta manera s'aconsegueix dirigir el virus cap a una àmplia varietat de tumors. D'altra banda, el promotor DF3/MUC1 és específic per càncers que expressen la glicoproteïna MUC1, com els de mama i ovaris, permetent un correcte direccionament dels virus cap a aquests tipus de càncers. L'ús combinat d'aquests promotors va resultar en un augment de la selectivitat i eficàcia del virus, minimitzant l'afectació a teixits sans.

5.3. Mecanismes per evitar la neutralització d'adenovirus oncolítics per part del sistema immunològic

Per desenvolupar les diverses estratègies utilitzades per embolcallar i transportar els virus amb l'objectiu d'eludir el sistema immunològic abans que el virus arribi al tumor, diferents investigacions han conjugat complexos a la superfície dels adenovirus, com anticossos, factors de creixement o petits pèptids. Així, s'han generat diferents estratègies per evitar la neutralització dels virus oncolítics per part del sistema immunològic. Aquestes estratègies consisteixen en la formació d'un escut o blindatge que permeti embolcallar el virus i ocultar-lo del sistema immunològic.

5.3.1. Recobriment amb polímers catiónics

Els adenovirus, que tenen una superfície carregada negativament, es poden recobrir amb polímers catiónics, com el polietilè glicol (PEG) (Kwon et al., 2013), l'*arginine-grafted bio-reducible polymer* (ABP) (Kim et al., 2010) o el polietilenimina (Choi et al., 2015), per protegir-los de la neutralització del sistema immunitari i millorar la seva penetració al tumor. Aquests polímers creen una capa protectora al voltant del virus, evitant la seva detecció pel sistema immunològic i millorant la seva estabilitat a la circulació sanguínia. D'aquesta manera, s'impedeix que els anticossos presents a la sang s'uneixin al virus i es promou l'arribada al tumor amb una major concentració i eficàcia. A més, les càrregues positives dels polímers milloren la interacció dels adenovirus amb les membranes cel·lulars, augmentant així la internalització del virus. Tot i això, aquest mecanisme redueix la citotoxicitat dels virus i presenta problemes de selectivitat, ja que les càrregues positives poden unir-se tant a cèl·lules tumorals com a cèl·lules sanes, cosa que limita l'eficàcia general d'aquestes teràpies (Guerrero-Fonseca et al., 2019).

Un exemple d'aquest tipus de recobriment és la unió d'un anticòs monoclonal, l'Herceptin, que s'usa per tractar el càncer de mama, a la superfície dels adenovirus mitjançant molècules PEG. Tot i així, aquesta estratègia no va ser molt eficient, ja que HER2/neu, el receptor al qual s'uneix específicament l'Herceptin, només està sobreexpressat en el 20-30% dels casos de càncer de mama (Kim et al., 2011).

També s'han desenvolupat estudis que utilitzen polímers per millorar la precisió dels adenovirus. Morrison et al. (2008) van utilitzar el polímer poli-(2-hidroxipropil) metacrilamida (pHPMA) unit al virus, juntament amb un lligand, el factor de creixement mEGF (factor de creixement epidèrmic murí), per a redirigir el virus a cèl·lules tumorals que sobreexpressen l'EGFR, receptor de mEGF. Encara que van millorar alguns efectes secundaris com les adhesions peritoneals i l'obstrucció intestinal, no es van observar diferències significatives en l'efecte antitumoral respecte l'hAd5 sense recobrir.

Un altre estudi realitzat per Kim et al. (2013) va utilitzar el polímer metoxipolietilenglicol amino (MPEG-NH₂) unit a l'adenovirus. En ratolins, tant amb fibrosarcoma humà com adenocarcinoma de pulmó, es va observar una reducció de l'atrapament del virus al fetge i una major localització al tumor, respecte a l'adenovirus no embolcallat. D'aquesta manera, el polímer permet evadir al sistema immunològic i, en especial, evita que els anticossos sèrics interfereixin amb l'adenovirus.

També s'han utilitzat aptàmers, que són àcids nucleics de cadena senzilla amb capacitat d'unir anticossos, per evitar que aquests bloquegin la infecció viral, conduint a una major infecció (Muharemagic et al., 2014).

En un altre estudi, es va unir electrostàticament l'aminoàcid L-carnosina a l'adenovirus per induir l'apoptosi en tumors de pulmó i còlon, ja que es tracta d'un compost amb efecte antiproliferatiu. Això va reduir el creixement tumoral en models de ratolins (Garofalo et al., 2016).

S'han arribat a dissenyar adenovirus recoberts amb polímers sensibles al pH, amb l'objectiu d'orientar-se específicament a tumors en condicions d'hipòxia i pH àcid, característiques típiques dels microambients tumorals. Aquests polímers sensibles al pH augmenten significativament la càrrega neta positiva a l'exposar-

se al microambient tumoral hipòxic, permetent així la orientació passiva al teixit tumoral (Guerrero-Fonseca et al., 2019).

Encara que aquestes estratègies poden millorar la localització i efectivitat dels virus en el tumor, moltes d'elles encara presenten problemes de selectivitat i efectes secundaris en cèl·lules sanes. A més, es necessiten més estudis sobre la seguretat dels materials, ja que les nanopartícules utilitzades podrien causar toxicitat o rebuig immunològic.

5.3.2. Ús de micropartícules

L'ús de micropartícules (MP) consisteix en una estratègia recent que es basa en la capacitat de les cèl·lules de generar vesícules de diferent mida al modificar el seu citoesquelet davant de diversos estímuls. Les MP, amb mides entre 0,1 μm i 1 μm , encapsulen material citoplasmàtic com enzims, RNA i DNA, i poden transferir molècules bioactives d'una cèl·lula a una altra. S'han utilitzat per transportar adenovirus o fàrmacs quimioteràpics a les cèl·lules tumorals (Guerrero-Fonseca et al., 2019).

Ran et al. (2016) van infectar cultius cel·lulars tumorals amb adenovirus per generar MP carregades amb aquests virus, que després van poder infectar altres cèl·lules tumorals, evitant així el reconeixement del virus pels anticossos. Tot i que es va aconseguir lliurar l'adenovirus a les cèl·lules tumorals, els investigadors no van aclarir el mecanisme pel qual els adenovirus carregats en les MP infecten i maten les cèl·lules canceroses, o si aquestes MP també podien infectar cèl·lules no tumorals. Tampoc es va analitzar la composició de les MP i el seu impacte en les cèl·lules que infecten.

Aquesta estratègia, tot i ser prometedora, planteja dubtes sobre la seguretat i l'efectivitat, especialment pel risc de transferència de material no viral a altres cèl·lules i per la possible falta d'especificitat.

5.3.3. Cèl·lules transportadores

Recentment, s'han desenvolupat diferents tipus de cèl·lules transportadores ("carrier cells") per lliurar virus oncolítics directament als tumors, evitant el reconeixement per anticossos i millorant l'eficàcia del tractament. Aquesta estratègia és especialment prometedora perquè permet utilitzar cèl·lules del mateix pacient, reduint el risc de rebuig immunològic. A més de protegir el virus

de la resposta immune, en alguns casos, augmenta la quantitat de virus gràcies a la replicació dins les cèl·lules transportadores (Kim et al., 2015).

Les cèl·lules transportadores poden variar segons el tipus de tumor (epitelial, mesenquimal o hematopoètic) i poden tractar-se de cèl·lules normals, tumorals o cèl·lules mare. Per exemple, s'han utilitzat macròfags infectats amb adenovirus per tractar tumors de pròstata en ratolins, millorant la supervivència dels ratolins (Muthana et al., 2013). En un altre estudi, els macròfags s'han utilitzat per inhibir el creixement tumoral prostàtic en zones hipòxiques, aprofitant l'afinitat natural dels macròfags per aquestes àrees. A més, els adenovirus van ser modificats amb un promotor induïble per hipòxia, induint la replicació viral en el macròfag, i promotors específics de pròstata, per una major afinitat de l'adenovirus per les cèl·lules tumorals prostàtiques (Muthana et al., 2011).

També s'han investigat l'ús de cèl·lules mare neuronals infectades amb adenovirus per tal de reduir el creixement de gliomes en ratolins i millorar la seva supervivència (Ahmed et al., 2011). A més, s'ha explorat l'ús d'anticossos preexistents per millorar la resposta antitumoral. Per exemple, en un estudi amb virus del xarampió, ratolins amb hepatocarcinoma que presentaven una elevada concentració d'anticossos neutralitzants van respondre millor al tractament administrat en cèl·lules mare mesenquimals derivades de medul·la òssia i infectades, que els tractats amb virus lliures (Ong et al., 2013).

Mahasa et al. (2020) va estudiar com l'ús de cèl·lules mare mesenquimals (MSC) com a vehicles de transport per a adenovirus oncolítics millora l'eficàcia de la viroteràpia. Les MSC són cèl·lules amb capacitat d'infiltrar-se en els tumors, però també de promoure el creixement tumoral. Mitjançant una combinació d'experiments tant *in vivo* com *in vitro*, així com models matemàtics, l'estudi va mostrar que les MSC milloren la distribució viral i la resposta antitumoral, augmentant l'eficàcia de la teràpia. Tot i els riscos potencials associats al creixement tumoral, l'article conclou que l'ús de MSC és prometedor per a la viroteràpia en càncer, permetent una millor distribució i replicació del virus en el tumor.

Franco-Luzón et al. (2020) han investigat l'eficàcia de l'administració sistèmica d'un adenovirus oncolític encapsulat en MSC per tractar neuroblastoma en models de ratolins. Els resultats mostren que aquesta estratègia modula

favorablement el microambient tumoral, augmentant la infiltració de cèl·lules immunitàries antitumorals i reduint la immunosupressió dins el tumor; és a dir, promovent un perfil menys protumoral i més inflamatori del microambient tumoral. A més, aquesta estratègia permet evitar la detecció per part del sistema immunitari, sobrepassant les limitacions de l'administració intravenosa, i millora l'acció antitumoral, suggerint un potencial tractament per a càncers pediàtrics resistents.

D'altra banda, un estudi en ratolins amb glioblastoma multiforme va combinar MSC encapsulades en una matriu sintètica amb un adenovirus que expressa hialuronidasa, aconseguint així una regressió significativa del càncer i millorant la supervivència dels ratolins (Martinez-Quintanilla et al., 2015).

5.3.4. Liposomes

Aquesta estratègia busca prolongar la circulació dels virus oncolítics i reduir la seva interacció amb anticossos neutralitzants i altres components sanguinis. Això permet una major biodisponibilitat del virus en el tumor, i una entrega més efectiva i controlada al teixit tumoral. En un estudi, es va administrar un adenovirus recombinat encapsulat en micel·les polimèriques de PEG i fosfatidiletanolamina (PEG-PE) a ratolins amb tumors d'ovari. Els resultats van mostrar una reducció del volum tumoral, amb un augment de l'apoptosis i major supervivència en comparació amb els grups control. A més, no es va desencadenar una resposta immune significativa contra el virus, fet que augmenta l'eficàcia del tractament (Yang et al., 2009).

Un altre investigació va encapsular els adenovirus en liposomes injectats directament en tumors. Aquest enfoc no només va reduir el tumor localment, sinó que també va induir un efecte abscopal; és a dir, una resposta antitumoral en àrees no tractades. Per tant, aquesta estratègia potencia l'activitat immunològica en models animals, millorant l'eficàcia del tractament tant en el lloc d'injecció com en tumors distants i oferint noves perspectives en la teràpia del càncer (Dong et al., 2023).

5.4. Supressió de barreres tumorals

5.4.1. Degradació de la matriu extracel·lular

El microambient tumoral, particularment en el càncer de pàncrees, és conegut per la seva densa matriu extracel·lular (MEC), que pot dificultar la penetració dels adenovirus. La MEC és una estructura complexa composta principalment per proteoglicans, col·làgens i àcid hialurònic que envolta les cèl·lules tumorals, proporcionant un suport estructural i actuant com una barrera física per als agents terapèutics. Per superar aquesta limitació, els investigadors han dissenyat adenovirus capaços d'expressar enzims que degraden aquesta matriu, com la hialuronidasa, facilitant la seva dispersió dins del tumor (Nattress & Halldén, 2018; Yoon et al., 2023; Zhang et al., 2022).

En un estudi, es van utilitzar adenovirus modificats per expressar hialuronidasa, un enzim que degrada l'àcid hialurònic present en la MEC. Això va permetre una millor penetració del virus dins del tumor, augmentant la dispersió intratumoral i la lisi de les cèl·lules canceroses. Els resultats van mostrar una major eficàcia en la reducció del volum tumoral i una millor distribució del virus a través del tumor, comparat amb adenovirus sense aquesta modificació (Guedan et al., 2010; Rodríguez-García et al., 2015).

Un altre estudi va desenvolupar adenovirus modificats per expressar col·lagenasa, un enzim capaç de degradar el col·lagen, component clau de la MEC. En models preclínics, l'expressió de col·lagenasa per part dels adenovirus va permetre una major dispersió del virus dins del tumor i una major efectivitat en la destrucció de les cèl·lules tumorals, especialment en tumors resistents a altres formes de tractament (Thaci et al., 2012).

5.4.2. Millora de la dispersió intratumoral

També existeixen modificacions genètiques que permeten als adenovirus dispersar-se millor dins del tumor, assegurant que la infecció arribi a un major nombre de cèl·lules tumorals. Això es pot aconseguir expressant proteïnes virals que faciliten la fusió cel·lular. Aquestes proteïnes permeten que les cèl·lules infectades es fusionin amb cèl·lules adjacents, formant sincicis (cèl·lules multinucleades), que poden ajudar a disseminar el virus de forma més efectiva dins del tumor.

Un exemple destacat és l'ús de la proteïna de fusió del virus sincític respiratori (RSV), que ha estat incorporada en adenovirus oncolítics. Els resultats dels estudis preclínics han mostrat que els adenovirus que expressen aquesta proteïna poden formar sincicis dins dels tumors, millorant la propagació viral i l'eficàcia terapèutica en models de càncer. A més, la formació d'aquests sincicis resulta en un augment de la mort cel·lular per apoptosi i la inhibició del creixement de les cèl·lules canceroses, molt probablement degut a l'activació de la via de p53 (Burton & Bartee, 2019; Wong et al., 2016).

5.4.3. Modulació de la vasculatura tumoral

La vasculatura tumoral és sovint desorganitzada i ineficient, cosa que limita la distribució dels agents terapèutics. Algunes estratègies s'han centrat en la normalització dels vasos sanguinis tumorals per millorar la distribució dels adenovirus oncolítics. Això es pot aconseguir mitjançant la modulació de factors de creixement angiogènics com el factor de creixement endotelial vascular (VEGF).

Els estudis han utilitzat adenovirus modificats per inhibir la via de senyalització de VEGF mitjançant l'expressió d'un *short hairpin* d'ARN (shRNA) específic de VEGF. La inhibició d'aquest factor de creixement va provocar una potent inhibició de l'angiogènesi i del creixement tumoral, resultant en la normalització de la vasculatura tumoral i, per tant, millorant la perfusió i la distribució del virus dins del tumor. Aquest enfocament no només millora la distribució dels adenovirus sinó que també augmenta l'eficàcia de les teràpies combinades amb quimioteràpia o immunoteràpia (Yoo et al., 2007; Zhang et al., 2022).

5.4.4. Superació de la resistència tumoral

El càncer de pàncrees sovint desenvolupa resistència a les teràpies a causa de l'expressió de factors de creixement i altres mecanismes que protegeixen les cèl·lules tumorals, com ara la via del factor de creixement transformador beta (TGF- β), un potent immunosupressor del microambient tumoral que té un paper fonamental en l'exclusió de les cèl·lules T (Mariathasan et al., 2018). Un estudi innovador va utilitzar adenovirus oncolítics que expressaven proteïnes capaces d'inhibir aquesta via (Hu et al., 2010). Aquest antagonista de TGF- β es tracta d'una proteïna de fusió del receptor II soluble del TGF β (sTGF β RIIFc) que s'ha

demostrat que suprimeix la metàstasi en models de ratolí (Yang et al., 2002). Combinant l'efecte de l'activitat oncolítica dels adenovirus sobre les cèl·lules tumorals i la funció de sTGF β RIIFc per a bloquejar la senyalització de TGF β , l'adenovirus que expressa sTGF β RIIFc (Ad.sTbRFc) va inhibir significativament la metàstasi del càncer de mama en ratolins (Hu et al., 2010). En models preclínics, la inhibició de TGF- β va disminuir l'immunosupressió en el microambient tumoral, augmentant l'efectivitat de la resposta immune i millorant els resultats terapèutics. D'aquesta manera també s'aconsegueix prevenir la propagació del càncer a altres parts del cos (Neuzillet et al., 2015).

5.5. Combinació amb altres teràpies

La combinació amb quimioteràpia o radioteràpia pot augmentar significativament l'eficàcia dels adenovirus oncolítics. Aquestes teràpies tradicionals poden debilitar el tumor, facilitant la penetració i replicació dels adenovirus. Per exemple, la combinació amb agents com la doxorubicina ha demostrat augmentar la destrucció de cèl·lules canceroses (Siurala et al., 2015; Yoon et al., 2023). En estudis preclínics, també s'ha investigat l'efecte sinèrgic de la combinació d'un adenovirus oncolític amb gemcitabina, un quimioteràpic àmpliament utilitzat en el tractament del càncer de pàncrees. La combinació va resultar en una reducció més gran del tumor en comparació amb la monoteràpia, suggerint que l'ús combinat pot superar la resistència que es desenvolupa amb els tractaments tradicionals. Això indicaria que, en el context clínic, l'estratègia combinada podria ser molt més efectiva que la monoteràpia (Mato-Berciano et al., 2017; Nattress & Halldén, 2018).

La radioteràpia també pot augmentar la permeabilitat dels tumors, facilitant l'entrada dels adenovirus. A més, la radiació indueix danys en l'ADN que fan les cèl·lules tumorals més vulnerables a la replicació viral, potenciant l'efecte oncolític dels adenovirus (Yoon et al., 2023).

La combinació amb immunoteràpia també ha demostrat ser prometedora. De fet, la combinació d'adenovirus oncolítics amb inhibidors de punts de control immunitari (*checkpoint inhibitors*), com els anticossos anti-PD-1, pot potenciar la resposta immune contra el tumor. Això ajuda a superar la immunosupressió induïda pel tumor, augmentant l'eficàcia terapèutica (Nattress & Halldén, 2018).

Avui dia, són pocs els estudis preclínic publicats que han utilitzat adenovirus oncolítics armats amb citocines per a millorar les teràpies amb cèl·lules CAR-T (*Chimeric Antigen Receptor T cells*). S'ha pogut observar que l'expressió del factor de necrosi tumoral alfa (TNF- α) i la IL-2 per adenovirus modificats genèticament milloraven l'eficàcia de las cèl·lules CAR-T de mesotelina en PDAC "fred". Aquesta teràpia combinada va transformar el microambient tumoral immunosupressor en un de "calent" per mitjà de l'augment del reclutament de cèl·lules T, la millora de la funció d'aquestes cèl·lules, la polarització dels macròfags cap al fenotip M1 i la promoció de la maduració de les cèl·lules dendrítiques (Tian et al., 2022; Watanabe et al., 2018).

6. CONCLUSIONS

- Els articles revisats demostren la versatilitat i el potencial dels adenovirus oncolítics com a teràpia contra el càncer, especialment en els casos més letals i resistents a les teràpies convencionals, com el càncer de pàncrees.
- Les diferents estratègies i els exemples d'estudi recollits en aquesta revisió reflecteixen la diversitat d'enfocaments que s'estan explorant per a millorar l'eficàcia i maximitzar l'impacte terapèutic dels adenovirus oncolítics.
- La modificació genètica dels virus, la millora de la seva capacitat per penetrar i dispersar-se en el tumor, la seva capacitat d'induir una resposta immune robusta, la superació de les barreres de resistència tumoral, i l'ús de teràpies combinades són exemples claus que estan sent investigats i, que mostren un gran potencial per millorar els resultats clínics i augmentar les opcions disponibles per a pacients amb tumors difícils de tractar.
- El desenvolupament d'aquests mecanismes d'optimització promou el ràpid avenç de l'ús d'adenovirus oncolítics cap a tractaments més efectius i segurs i amb l'objectiu de superar les limitacions actuals, cosa que és necessari per a la seva aplicació clínica.
- Les estratègies esmentades en aquesta revisió només han mostrat una modesta eficàcia antitumoral, en comparació a la resposta que s'esperaria. És per això que la investigació de mecanismes d'optimització en l'ús d'adenovirus oncolítics segueix sent necessària.

7. AUTOAVALUACIÓ

El procés de realització del meu Treball de Final de Grau ha sigut una experiència enriquidora tant en l'àmbit acadèmic com en el personal, que m'ha permès aplicar de forma pràctica els coneixements adquirits al llarg del grau, alhora que he desenvolupat competències que considero fonamentals per la meua futura vida professional.

Vaig escollir un tema que em semblava rellevant per la investigació de futures teràpies alternatives pel càncer, a més de ser una de les línies de recerca del grup on vaig realitzar les pràctiques externes del grau. És per això que esperava que aquest projecte m'ajudés a aprofundir i consolidar els meus coneixements previs sobre el camp, al temps que em permetria millorar la meua capacitat crítica i de síntesi davant de la informació recopilada.

Al llarg del treball, he anat millorant les meves habilitats de cerca i selecció de fonts rellevants, així com també he millorat en l'anàlisi crítica de la informació. La meua capacitat d'organitzar-me i distribuir el treball en blocs m'ha permès controlar l'estrès i evitar l'acumulació de tasques al final del procés. Tot i que he comptat amb el suport de la meua tutora, aquest treball m'ha exigut prendre moltes decisions pel meu compte, des de l'elecció de les fonts fins a l'enfoc final del treball, cosa que m'ha fet guanyar confiança en el meu criteri.

A nivell personal, el TFG ha suposat un repte en molts aspectes, sobretot quan no obtenia els resultats esperats o quan m'enfrontava a la necessitat de reestructurar parts del treball. Tot i així, aquestes experiències m'han ajudat a aprendre a gestionar la frustració de manera constructiva. També considero que la meua capacitat de treballar de forma autònoma i de resolució de problemes ha millorat considerablement. He après a ser més flexible, a replantejar estratègies quan alguna cosa no funciona i a buscar solucions de forma proactiva.

En resum, la realització d'aquest TFG ha superat les meves expectatives inicials respecte als aprenentatges adquirits i el meu creixement personal i, tot i haver estat un procés exigent, el resultat final m'omple de satisfacció.

8. REFERÈNCIES

- Ahi, Y. S., & Mittal, S. K. (2016). Components of adenovirus genome packaging. *Frontiers in Microbiology*, 7(SEP), 214495. <https://doi.org/10.3389/FMICB.2016.01503/BIBTEX>
- Ahmed, A. U., Thaci, B., Alexiades, N. G., Han, Y., Qian, S., Liu, F., Balyasnikova, I. V., Ulasov, I. Y., Aboody, K. S., & Lesniak, M. S. (2011). Neural stem cell-based cell carriers enhance therapeutic efficacy of an oncolytic adenovirus in an orthotopic mouse model of human glioblastoma. *Molecular Therapy*, 19(9), 1714–1726. <https://doi.org/10.1038/mt.2011.100>
- Akusjarvi, G. (2008). Temporal regulation of adenovirus major late alternative RNA splicing. *Frontiers in Bioscience: A Journal and Virtual Library*, 13(13), 5006–5015. <https://doi.org/10.2741/3059>
- Aleman, R. (2016). Molecular Design of Oncolytic Adenoviruses. *Adenoviral Vectors for Gene Therapy: Second Edition*, 319–334. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-800276-6.00012-7>
- Aleman, R., & Curiel, D. T. (2001). CAR-binding ablation does not change biodistribution and toxicity of adenoviral vectors. *Gene Therapy*, 8(17), 1347–1353. <https://doi.org/10.1038/SJ.GT.3301515>
- Aleman, R., Suzuki, K., & Curiel, D. T. (2000). Blood clearance rates of adenovirus type 5 in mice. *The Journal of General Virology*, 81(Pt 11), 2605–2609. <https://doi.org/10.1099/0022-1317-81-11-2605>
- Allen, R. J., & Byrnes, A. P. (2019). Interaction of adenovirus with antibodies, complement, and coagulation factors. *FEBS Letters*, 593(24), 3449–3460. <https://doi.org/10.1002/1873-3468.13649>
- Andtbacka, R. H. I., Ross, M., Puzanov, I., Milhem, M., Collichio, F., Delman, K. A., Amatruda, T., Zager, J. S., Cranmer, L., Hsueh, E., Chen, L., Shilkrut, M., & Kaufman, H. L. (2016). Patterns of Clinical Response with Talimogene Laherparepvec (T-VEC) in Patients with Melanoma Treated in the OPTiM Phase III Clinical Trial. *Annals of Surgical Oncology*, 23(13), 4169–4177. <https://doi.org/10.1245/S10434-016-5286-0>
- Barry, M. A., Rubin, J. D., & Lu, S. C. (2020). Retargeting Adenoviruses for therapeutic and vaccine applications. *FEBS Letters*, 594(12), 1918. <https://doi.org/10.1002/1873-3468.13731>
- Basnet, S., Santos, J. M., Quixabeira, D. C. A., Clubb, J. H. A., Grönberg-Vähä-Koskela, S. A. M., Arias, V., Pakola, S., Kudling, T. V., Heiniö, C., Havunen, R., Cervera-Carrascon, V., Sorsa, S., Anttila, M., Kanerva, A., & Hemminki, A. (2022). Oncolytic adenovirus coding for bispecific T cell engager against human MUC-1 potentiates T

- cell response against solid tumors. *Molecular Therapy Oncolytics*, 28, 59–73. <https://doi.org/10.1016/J.OMTO.2022.12.007>
- Bergelson, J. M., Cunningham, J. A., Droguett, G., Kurt-Jones, E. A., Krithivas, A., Hong, J. S., Horwitz, M. S., Crowell, R. L., & Finberg, R. W. (1997). Isolation of a common receptor for Coxsackie B viruses and adenoviruses 2 and 5. *Science (New York, N.Y.)*, 275(5304), 1320–1323. <https://doi.org/10.1126/SCIENCE.275.5304.1320>
- Berk, A. J. (2005). Recent lessons in gene expression, cell cycle control, and cell biology from adenovirus. *Oncogene*, 24(52), 7673–7685. <https://doi.org/10.1038/SJ.ONC.1209040>
- Bertzbach, L. D., Ip, W. H., & Dobner, T. (2021). Animal Models in Human Adenovirus Research. *Biology*, 10(12). <https://doi.org/10.3390/BIOLOGY10121253>
- Bischoff, J. R., Kirn, D. H., Williams, A., Heise, C., Horn, S., Muna, M., Ng, L., Nye, J. A., Sampson-Johannes, A., Fattaey, A., & McCormick, F. (1996). An adenovirus mutant that replicates selectively in p53-deficient human tumor cells. *Science (New York, N.Y.)*, 274(5286), 373–376. <https://doi.org/10.1126/SCIENCE.274.5286.373>
- Bramante, S., Koski, A., Kipar, A., Diaconu, I., Liikanen, I., Hemminki, O., Vassilev, L., Parviainen, S., Cerullo, V., Pesonen, S. K., Oksanen, M., Heiskanen, R., Rouvinen-Lagerström, N., Merisalo-Soikkeli, M., Hakonen, T., Joensuu, T., Kanerva, A., Pesonen, S., & Hemminki, A. (2014). Serotype chimeric oncolytic adenovirus coding for GM-CSF for treatment of sarcoma in rodents and humans. *International Journal of Cancer*, 135(3), 720–730. <https://doi.org/10.1002/IJC.28696>
- Burton, C., & Bartee, E. (2019). Syncytia Formation in Oncolytic Virotherapy. *Molecular Therapy - Oncolytics*, 15, 131–139. <https://doi.org/10.1016/J.OMTO.2019.09.006>
- Carrillo, M. A., Zhen, A., & Kitchen, S. G. (2018). The use of the humanized mouse model in gene therapy and immunotherapy for HIV and cancer. *Frontiers in Immunology*, 9(APR), 343971. <https://doi.org/10.3389/FIMMU.2018.00746/BIBTEX>
- Choi, J. W., Nam, J. P., Nam, K., Lee, Y. S., Yun, C. O., & Kim, S. W. (2015). Oncolytic Adenovirus Coated with Multidegradable Bioreducible Core-Cross-Linked Polyethylenimine for Cancer Gene Therapy. *Biomacromolecules*, 16(7), 2132–2143. <https://doi.org/10.1021/ACS.BIOMAC.5B00538>
- Davison, A. J., Benko, M., & Harrach, B. (2003). Genetic content and evolution of adenoviruses. *Journal of General Virology*, 84(11), 2895–2908. <https://doi.org/10.1099/VIR.0.19497-0/CITE/REFWORKS>
- De Sostoa, J., Fajardo, C. A., Moreno, R., Ramos, M. D., Farrera-Sal, M., & Alemany, R. (2019). Targeting the tumor stroma with an oncolytic adenovirus secreting a fibroblast activation protein-targeted bispecific T-cell engager. *Journal for Immunotherapy of Cancer*, 7(1). <https://doi.org/10.1186/S40425-019-0505-4>

- DeCaprio, J. A. (2009). How the Rb tumor suppressor structure and function was revealed by the study of Adenovirus and SV40. *Virology*, 384(2), 274–284. <https://doi.org/10.1016/J.VIROL.2008.12.010>
- Dechecchi, M. C., Tamanini, A., Bonizzato, A., & Cabrini, G. (2000). Heparan sulfate glycosaminoglycans are involved in adenovirus type 5 and 2-host cell interactions. *Virology*, 268(2), 382–390. <https://doi.org/10.1006/VIRO.1999.0171>
- Dhingra, A., Hage, E., Ganzenmueller, T., Böttcher, S., Hofmann, J., Hamprecht, K., Obermeier, P., Rath, B., Hausmann, F., Dobner, T., & Heim, A. (2019). Molecular Evolution of Human Adenovirus (HAdV) Species C. *Scientific Reports 2019 9:1*, 9(1), 1–13. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-37249-4>
- Doloff, J. C., & Waxman, D. J. (2011). Dual E1A oncolytic adenovirus: targeting tumor heterogeneity with two independent cancer-specific promoter elements, DF3/MUC1 and hTERT. *Cancer Gene Therapy*, 18(3), 153–166. <https://doi.org/10.1038/CGT.2010.52>
- Dong, T., Shah, J. R., Phung, A. T., Larson, C., Sanchez, A. B., Aisagbonhi, O., Blair, S. L., Oronsky, B., Trogler, W. C., Reid, T., & Kummel, A. C. (2023). A Local and Abscopal Effect Observed with Liposomal Encapsulation of Intratumorally Injected Oncolytic Adenoviral Therapy. *Cancers*, 15(12). <https://doi.org/10.3390/CANCERS15123157>
- Farrera-Sal, M., Fillat, C., & Alemany, R. (2020). Effect of Transgene Location, Transcriptional Control Elements and Transgene Features in Armed Oncolytic Adenoviruses. *Cancers*, 12(4). <https://doi.org/10.3390/CANCERS12041034>
- Farrera-Sal, M., Moya-Borrego, L., Bazan-Peregrino, M., & Alemany, R. (2021). Evolving status of clinical immunotherapy with oncolytic adenovirus. *Clinical Cancer Research*, 27(11), 2979–2988. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-20-1565/78338/AM/EVOLVING-STATUS-OF-CLINICAL-IMMUNOTHERAPY-WITH>
- Frampton, J. E. (2022). Teserpaturev/G47Δ: First Approval. *BioDrugs: Clinical Immunotherapeutics, Biopharmaceuticals and Gene Therapy*, 36(5), 667–672. <https://doi.org/10.1007/S40259-022-00553-7>
- Franco-Luzón, L., González-Murillo, Á., Alcántara-Sánchez, C., García-García, L., Tabasi, M., Huertas, A. L., Chesler, L., & Ramírez, M. (2020). Systemic oncolytic adenovirus delivered in mesenchymal carrier cells modulate tumor infiltrating immune cells and tumor microenvironment in mice with neuroblastoma. *Oncotarget*, 11(4), 347–361. <https://doi.org/10.18632/ONCOTARGET.27401>
- Freedman, J. D., Hagel, J., Scott, E. M., Psallidas, I., Gupta, A., Spiers, L., Miller, P., Kanellakis, N., Ashfield, R., Fisher, K. D., Duffy, M. R., & Seymour, L. W. (2017). Oncolytic adenovirus expressing bispecific antibody targets T-cell cytotoxicity in

- cancer biopsies. *EMBO Molecular Medicine*, 9(8), 1067–1087. <https://doi.org/10.15252/EMMM.201707567>
- Freudenberger, N., Meyer, T., Groitl, P., Dobner, T., & Schreiner, S. (2018). Human Adenovirus Core Protein V Is Targeted by the Host SUMOylation Machinery To Limit Essential Viral Functions. *Journal of Virology*, 92(4). <https://doi.org/10.1128/JVI.01451-17>
- Gallardo, J., Pérez-Illana, M., Martín-González, N., & Martín, C. S. (2021). Adenovirus Structure: What Is New? *International Journal of Molecular Sciences*, 22(10), 5240. <https://doi.org/10.3390/IJMS22105240>
- Galluzzi, L., Kepp, O., Hett, E., Kroemer, G., & Marincola, F. M. (2023). Immunogenic cell death in cancer: concept and therapeutic implications. *Journal of Translational Medicine*, 21(1), 1–8. <https://doi.org/10.1186/S12967-023-04017-6/TABLES/1>
- Garofalo, M., Iovine, B., Kuryk, L., Capasso, C., Hirvonen, M., Vitale, A., Yliperttula, M., Bevilacqua, M. A., & Cerullo, V. (2016). Oncolytic adenovirus loaded with L-carnosine as novel strategy to enhance the antitumor activity. *Molecular Cancer Therapeutics*, 15(4), 651–660. <https://doi.org/10.1158/1535-7163.MCT-15-0559/87097/AM/ONCOLYTIC-ADENOVIRUS-LOADED-WITH-L-CARNOSINE-AS>
- Greber, U. F., Suomalainen, M., Stidwill, R. P., Boucke, K., Ebersold, M. W., & Helenius, A. (1997). The role of the nuclear pore complex in adenovirus DNA entry. *The EMBO Journal*, 16(19), 5998–6007. <https://doi.org/10.1093/EMBOJ/16.19.5998>
- Gros, A. (2013). Adenovirus Release from the Infected Cell as a Key Factor for Adenovirus Oncolysis. *The Open Gene Therapy Journal*, 3(1), 24–30. <https://doi.org/10.2174/1875037001003010024>
- Guedan, S., Rojas, J. J., Gros, A., Mercade, E., Cascallo, M., & Alemany, R. (2010). Hyaluronidase Expression by an Oncolytic Adenovirus Enhances Its Intratumoral Spread and Suppresses Tumor Growth. *Molecular Therapy*, 18(7), 1275–1283. <https://doi.org/10.1038/MT.2010.79>
- Guerrero-Fonseca, C. A., López-Baquero, M. A., Bedoya-Rodríguez, A. A., Guerrero-Fonseca, C. A., López-Baquero, M. A., & Bedoya-Rodríguez, A. A. (2019). Virus oncolíticos: un arma contra el cáncer. *Revista de La Facultad de Medicina*, 67(2), 313–324. <https://doi.org/10.15446/REVFACMED.V67N2.68347>
- Hamdan, F., Fuscillo, M., & Cerullo, V. (2023). Personalizing Oncolytic Virotherapy. *Human Gene Therapy*, 34(17–18), 870–877. <https://doi.org/10.1089/HUM.2023.122>
- Hemminki, O., Parviainen, S., Juhila, J., Turkki, R., Linder, N., Lundin, J., Kankainen, M., Ristimäki, A., Koski, A., Liikanen, I., Oksanen, M., Nettelbeck, D. M., Kairemo, K., Partanen, K., Joensuu, T., Kanerva, A., & Hemminki, A. (2015). Immunological data from cancer patients treated with Ad5/3-E2F-Δ24-GMCSF suggests utility for tumor

- immunotherapy. *Oncotarget*, 6(6), 4467.
<https://doi.org/10.18632/ONCOTARGET.2901>
- Hoeben, R. C., & Uil, T. G. (2013). Adenovirus DNA Replication. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, 5(3). <https://doi.org/10.1101/CSHPERSPECT.A013003>
- Hu, Z., Zhang, Z., Guise, T., & Seth, P. (2010). Systemic Delivery of an Oncolytic Adenovirus Expressing Soluble Transforming Growth Factor- β Receptor II-Fc Fusion Protein Can Inhibit Breast Cancer Bone Metastasis in a Mouse Model. *https://Home.Liebertpub.Com/Hum*, 21(11), 1623–1629.
<https://doi.org/10.1089/HUM.2010.018>
- Huch, M., Gros, A., José, A., González, J. R., Alemany, R., & Fillat, C. (2009). Urokinase-type plasminogen activator receptor transcriptionally controlled adenoviruses eradicate pancreatic tumors and liver metastasis in mouse models. *Neoplasia (New York, N. Y.)*, 11(6), 518–528. <https://doi.org/10.1593/NEO.81674>
- Irving, J., Wang, Z., Powell, S., O'Sullivan, C., Mok, M., Murphy, B., Cardoza, L., Lebkowski, J. S., & Majumdar, A. S. (2004). Conditionally replicative adenovirus driven by the human telomerase promoter provides broad-spectrum antitumor activity without liver toxicity. *Cancer Gene Therapy*, 11(3), 174–185. <https://doi.org/10.1038/sj.cgt.7700666>
- Kaliberov, S. A., Kaliberova, L. N., Yan, H., Kapoor, V., & Hallahan, D. E. (2016). Retargeted adenoviruses for radiation-guided gene delivery. *Cancer Gene Therapy*, 23(9), 303–314. <https://doi.org/10.1038/CGT.2016.32>
- Källsten, M., Gromova, A., Zhao, H., Valdés, A., Konzer, A., Pettersson, U., & Lind, S. B. (2017). Temporal characterization of the non-structural Adenovirus type 2 proteome and phosphoproteome using high-resolving mass spectrometry. *Virology*, 511, 240–248. <https://doi.org/10.1016/J.VIROL.2017.08.032>
- Kanerva, A., Wang, M., Bauerschmitz, G. J., Lam, J. T., Desmond, R. A., Bhoola, S. M., Barnes, M. N., Alvarez, R. D., Siegal, G. P., Curiel, D. T., & Hemminki, A. (2002). Gene transfer to ovarian cancer versus normal tissues with fiber-modified adenoviruses. *Molecular Therapy*, 5(6), 695–704. <https://doi.org/10.1006/mthe.2002.0599>
- Karen, K. A., & Hearing, P. (2011). Adenovirus Core Protein VII Protects the Viral Genome from a DNA Damage Response at Early Times after Infection. *Journal of Virology*, 85(9), 4135. <https://doi.org/10.1128/JVI.02540-10>
- Kaufman, H. L., Kohlhapp, F. J., & Zloza, A. (2015). Oncolytic viruses: a new class of immunotherapy drugs. *Nature Reviews. Drug Discovery*, 14(9), 642. <https://doi.org/10.1038/NRD4663>
- Kelly, E., & Russell, S. J. (2007). History of oncolytic viruses: genesis to genetic engineering. *Molecular Therapy: The Journal of the American Society of Gene Therapy*, 15(4), 651–659. <https://doi.org/10.1038/SJ.MT.6300108>

- Khanal, S., Ghimire, P., & Dhamoon, A. S. (2018). The Repertoire of Adenovirus in Human Disease: The Innocuous to the Deadly. *Biomedicines*, 6(1). <https://doi.org/10.3390/BIOMEDICINES6010030>
- Kim, J., Hall, R. R., Lesniak, M. S., & Ahmed, A. U. (2015). Stem Cell-Based Cell Carrier for Targeted Oncolytic Virotherapy: Translational Opportunity and Open Questions. *Viruses* 2015, Vol. 7, Pages 6200-6217, 7(12), 6200–6217. <https://doi.org/10.3390/V7122921>
- Kim, J., Li, Y., Kim, S. W., Lee, D. S., & Yun, C. O. (2013). Therapeutic efficacy of a systemically delivered oncolytic adenovirus – Biodegradable polymer complex. *Biomaterials*, 34(19), 4622–4631. <https://doi.org/10.1016/J.BIOMATERIALS.2013.03.004>
- Kim, P. H., Kim, T. il, Yockman, J. W., Kim, S. W., & Yun, C. O. (2010). The effect of surface modification of adenovirus with an arginine-grafted bioreducible polymer on transduction efficiency and immunogenicity in cancer gene therapy. *Biomaterials*, 31(7), 1865–1874. <https://doi.org/10.1016/J.BIOMATERIALS.2009.11.043>
- Kim, P. H., Sohn, J. H., Choi, J. W., Jung, Y., Kim, S. W., Haam, S., & Yun, C. O. (2011). Active targeting and safety profile of PEG-modified adenovirus conjugated with herceptin. *Biomaterials*, 32(9), 2314–2326. <https://doi.org/10.1016/J.BIOMATERIALS.2010.10.031>
- Kurihara, T., Brough, D. E., Kovesdi, I., & Kufe, D. W. (2000). Selectivity of a replication-competent adenovirus for human breast carcinoma cells expressing the MUC1 antigen. *The Journal of Clinical Investigation*, 106(6), 763–771. <https://doi.org/10.1172/JCI9180>
- Kwon, O. J., Kang, E., Choi, J. W., Kim, S. W., & Yun, C. O. (2013). Therapeutic targeting of chitosan–PEG–folate-complexed oncolytic adenovirus for active and systemic cancer gene therapy. *Journal of Controlled Release*, 169(3), 257–265. <https://doi.org/10.1016/J.JCONREL.2013.03.030>
- Lee, J. chan, Shin, D. W., Park, H., Kim, J., Youn, Y., Kim, J. H., Kim, J., & Hwang, J. H. (2020). Tolerability and safety of EUS-injected adenovirus-mediated double-suicide gene therapy with chemotherapy in locally advanced pancreatic cancer: a phase 1 trial. *Gastrointestinal Endoscopy*, 92(5), 1044-1052.e1. <https://doi.org/10.1016/J.GIE.2020.02.012>
- Leopold, P. L., Kreitzer, G., Miyazawa, N., Rempel, S., Pfister, K. K., Rodriguez-Boulan, E., & Crystal, R. G. (2000). Dynein- and microtubule-mediated translocation of adenovirus serotype 5 occurs after endosomal lysis. *Human Gene Therapy*, 11(1), 151–165. <https://doi.org/10.1089/10430340050016238>

- Li, K., Zhao, Y., Hu, X., Jiao, J., Wang, W., & Yao, H. (2022). Advances in the clinical development of oncolytic viruses. *American Journal of Translational Research*, 14(6), 4192. /pmc/articles/PMC9274612/
- Li, Y., Hong, J. W., Oh, J. E., Yoon, A. R., & Yun, C. O. (2018). Potent antitumor effect of tumor microenvironment-targeted oncolytic adenovirus against desmoplastic pancreatic cancer. *International Journal of Cancer*, 142(2), 392–413. <https://doi.org/10.1002/IJC.31060>
- Liang, M. (2018). Oncorine, the World First Oncolytic Virus Medicine and its Update in China. *Current Cancer Drug Targets*, 18(2), 171–176. <https://doi.org/10.2174/1568009618666171129221503>
- Lichtenstein, D. L., Toth, K., Doronin, K., Tollefson, A. E., & Wold, W. S. M. (2004). Functions and mechanisms of action of the adenovirus E3 proteins. *International Reviews of Immunology*, 23(1–2), 75–111. <https://doi.org/10.1080/08830180490265556>
- Lin, D., Shen, Y., & Liang, T. (2023). Oncolytic virotherapy: basic principles, recent advances and future directions. *Signal Transduction and Targeted Therapy* 2023 8:1, 8(1), 1–29. <https://doi.org/10.1038/s41392-023-01407-6>
- Mahalingam, D., Goel, S., Aparo, S., Arora, S. P., Noronha, N., Tran, H., Chakrabarty, R., Selvaggi, G., Gutierrez, A., Coffey, M., Nawrocki, S. T., Nuovo, G., & Mita, M. M. (2018). A Phase II Study of Pelareorep (REOLYSIN®) in Combination with Gemcitabine for Patients with Advanced Pancreatic Adenocarcinoma. *Cancers*, 10(6). <https://doi.org/10.3390/CANCERS10060160>
- Mahasa, K. J., de Pillis, L., Ouifki, R., Eladdadi, A., Maini, P., Yoon, A. R., & Yun, C. O. (2020). Mesenchymal stem cells used as carrier cells of oncolytic adenovirus results in enhanced oncolytic virotherapy. *Scientific Reports*, 10(1). <https://doi.org/10.1038/S41598-019-57240-X>
- Mantwill, K., Klein, F. G., Wang, D., Hindupur, S. V., Ehrenfeld, M., Holm, P. S., & Nawroth, R. (2021). Concepts in Oncolytic Adenovirus Therapy. *International Journal of Molecular Sciences*, 22(19), 10522. <https://doi.org/10.3390/IJMS221910522>
- Mariathasan, S., Turley, S. J., Nickles, D., Castiglioni, A., Yuen, K., Wang, Y., Kadel, E. E., Koepfen, H., Astarita, J. L., Cubas, R., Jhunjhunwala, S., Banchereau, R., Yang, Y., Guan, Y., Chalouni, C., Ziai, J., Şenbabaoğlu, Y., Santoro, S., Sheinson, D., ... Powles, T. (2018). TGFβ attenuates tumour response to PD-L1 blockade by contributing to exclusion of T cells. *Nature* 2018 554:7693, 554(7693), 544–548. <https://doi.org/10.1038/nature25501>
- Martinez-Quintanilla, J., He, D., Wakimoto, H., Alemany, R., & Shah, K. (2015). Encapsulated stem cells loaded with hyaluronidase-expressing oncolytic virus for brain

- tumor therapy. *Molecular Therapy*, 23(1), 108–118. <https://doi.org/10.1038/mt.2014.204>
- Mato-Berciano, A., Raimondi, G., Maliandi, M. V., Alemany, R., Montoliu, L., & Fillat, C. (2017). A NOTCH-sensitive uPAR-regulated oncolytic adenovirus effectively suppresses pancreatic tumor growth and triggers synergistic anticancer effects with gemcitabine and nab-paclitaxel. *Oncotarget*, 8(14), 22700–22715. <https://doi.org/10.18632/ONCOTARGET.15169>
- McKenna, M. K., Rosewell-Shaw, A., & Suzuki, M. (2020). Modeling the Efficacy of Oncolytic Adenoviruses In Vitro and In Vivo: Current and Future Perspectives. *Cancers*, 12(3). <https://doi.org/10.3390/CANCERS12030619>
- Meier, O., & Greber, U. F. (2004). Adenovirus endocytosis. *The Journal of Gene Medicine*, 6(S1), S152–S163. <https://doi.org/10.1002/JGM.553>
- Morrison, J., Briggs, S. S., Green, N., Fisher, K., Subr, V., Ulbrich, K., Kehoe, S., & Seymour, L. W. (2008). Virotherapy of ovarian cancer with polymer-cloaked adenovirus retargeted to the epidermal growth factor receptor. *Molecular Therapy*, 16(2), 244–251. <https://doi.org/10.1038/sj.mt.6300363>
- Muharemagic, D., Zamay, A., Ghobadloo, S. M., Evgin, L., Savitskaya, A., Bell, J. C., & Berezovski, M. V. (2014). Aptamer-facilitated protection of oncolytic virus from neutralizing antibodies. *Molecular Therapy Nucleic Acids*, 3. <https://doi.org/10.1038/mtna.2014.19>
- Muthana, M., Giannoudis, A., Scott, S. D., Fang, H. Y., Coffelt, S. B., Morrow, F. J., Murdoch, C., Burton, J., Cross, N., Burke, B., Mistry, R., Hamdy, F., Brown, N. J., Georgopoulos, L., Hoskin, P., Essand, M., Lewis, C. E., & Maitland, N. J. (2011). Use of macrophages to target therapeutic adenovirus to human prostate tumors. *Cancer Research*, 71(5), 1805–1815. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-10-2349/649514/AM/USE-OF-MACROPHAGES-TO-TARGET-THERAPEUTIC>
- Muthana, M., Rodrigues, S., Chen, Y. Y., Welford, A., Hughes, R., Tazzyman, S., Essand, M., Morrow, F., & Lewis, C. E. (2013). Macrophage delivery of an oncolytic virus abolishes tumor regrowth and metastasis after chemotherapy or irradiation. *Cancer Research*, 73(2), 490–495. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-12-3056/650763/AM/MACROPHAGE-DELIVERY-OF-AN-ONCOLYTIC-VIRUS>
- Nattress, C. B., & Halldén, G. (2018). Advances in oncolytic adenovirus therapy for pancreatic cancer. *Cancer Letters*, 434, 56–69. <https://doi.org/10.1016/J.CANLET.2018.07.006>
- Nemerow, G., & Flint, J. (2019). Lessons learned from adenovirus (1970–2019). *FEBS Letters*, 593(24), 3395–3418. <https://doi.org/10.1002/1873-3468.13700>

- Neuzillet, C., Tijeras-Raballand, A., Cohen, R., Cros, J., Faivre, S., Raymond, E., & De Gramont, A. (2015). Targeting the TGF β pathway for cancer therapy. *Pharmacology & Therapeutics*, 147, 22–31. <https://doi.org/10.1016/J.PHARMTHERA.2014.11.001>
- Núñez-Manchón, E., Farrera-Sal, M., Otero-Mateo, M., Castellano, G., Moreno, R., Medel, D., Alemany, R., Villanueva, E., & Fillat, C. (2021). Transgene codon usage drives viral fitness and therapeutic efficacy in oncolytic adenoviruses. *NAR Cancer*, 3(2). <https://doi.org/10.1093/NARCAN/ZCAB015>
- Oh, E., Oh, J. E., Hong, J. W., Chung, Y. H., Lee, Y., Park, K. D., Kim, S., & Yun, C. O. (2017). Optimized biodegradable polymeric reservoir-mediated local and sustained co-delivery of dendritic cells and oncolytic adenovirus co-expressing IL-12 and GM-CSF for cancer immunotherapy. *Journal of Controlled Release: Official Journal of the Controlled Release Society*, 259, 115–127. <https://doi.org/10.1016/J.JCONREL.2017.03.028>
- Ong, H. T., Federspiel, M. J., Guo, C. M., Ooi, L. L., Russell, S. J., Peng, K. W., & Hui, K. M. (2013). Systemically delivered measles virus-infected mesenchymal stem cells can evade host immunity to inhibit liver cancer growth. *Journal of Hepatology*, 59(5), 999–1006. <https://doi.org/10.1016/J.JHEP.2013.07.010>
- O'Shea, C. C., Johnson, L., Bagus, B., Choi, S., Nicholas, C., Shen, A., Boyle, L., Pandey, K., Soria, C., Kunich, J., Shen, Y., Habets, G., Ginzinger, D., & McCormick, F. (2004). Late viral RNA export, rather than p53 inactivation, determines ONYX-015 tumor selectivity. *Cancer Cell*, 6(6), 611–623. <https://doi.org/10.1016/j.ccr.2004.11.012>
- Parker, A. L., Waddington, S. N., Nicol, C. G., Shayakhmetov, D. M., Buckley, S. M., Denby, L., Kemball-Cook, G., Ni, S., Lieber, A., McVey, J. H., Nicklin, S. A., & Baker, A. H. (2006). Multiple vitamin K-dependent coagulation zymogens promote adenovirus-mediated gene delivery to hepatocytes. *Blood*, 108(8), 2554–2561. <https://doi.org/10.1182/BLOOD-2006-04-008532>
- Peter, M., & Kühnel, F. (2020). Oncolytic Adenovirus in Cancer Immunotherapy. *Cancers*, 12(11), 1–23. <https://doi.org/10.3390/CANCERS12113354>
- Poutou, J., Bunuales, M., Gonzalez-Aparicio, M., Garcia-Aragoncillo, E., Quetglas, J. I., Casado, R., Bravo-Perez, C., Alzuguren, P., & Hernandez-Alcoceba, R. (2015). Safety and antitumor effect of oncolytic and helper-dependent adenoviruses expressing interleukin-12 variants in a hamster pancreatic cancer model. *Gene Therapy*, 22(9), 696–706. <https://doi.org/10.1038/GT.2015.45>
- Puig-Saus, C., Gros, A., Alemany, R., & Cascalló, M. (2012). Adenovirus i-leader truncation bioselected against cancer-associated fibroblasts to overcome tumor stromal barriers. *Molecular Therapy: The Journal of the American Society of Gene Therapy*, 20(1), 54–62. <https://doi.org/10.1038/MT.2011.159>

- Ran, L., Tan, X., Li, Y., Zhang, H., Ma, R., Ji, T., Dong, W., Tong, T., Liu, Y., Chen, D., Yin, X., Liang, X., Tang, K., Ma, J., Zhang, Y., Cao, X., Hu, Z., Qin, X., & Huang, B. (2016). Delivery of oncolytic adenovirus into the nucleus of tumorigenic cells by tumor microparticles for virotherapy. *Biomaterials*, 89, 56–66. <https://doi.org/10.1016/J.BIOMATERIALS.2016.02.025>
- Ranki, T., Pesonen, S., Hemminki, A., Partanen, K., Kairemo, K., Alanko, T., Lundin, J., Linder, N., Turkki, R., Ristimäki, A., Jäger, E., Karbach, J., Wahle, C., Kankainen, M., Backman, C., von Euler, M., Haavisto, E., Hakonen, T., Heiskanen, R., ... Joensuu, T. (2016). Phase I study with ONCOS-102 for the treatment of solid tumors - an evaluation of clinical response and exploratory analyses of immune markers. *Journal for Immunotherapy of Cancer*, 4(1). <https://doi.org/10.1186/S40425-016-0121-5>
- Rodríguez-García, A., Giménez-Alejandro, M., Rojas, J. J., Moreno, R., Bazan-Peregrino, M., Cascalló, M., & Ramon, A. (2015). Safety and efficacy of VCN-01, an oncolytic adenovirus combining fiber HSG-binding domain replacement with RGD and hyaluronidase expression. *Clinical Cancer Research*, 21(6), 1406–1418. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-14-2213>
- Rojas, J. J., Cascallo, M., Guedan, S., Gros, A., Martinez-Quintanilla, J., Hemminki, A., & Alemany, R. (2009). A modified E2F-1 promoter improves the efficacy to toxicity ratio of oncolytic adenoviruses. *Gene Therapy*, 16(12), 1441–1451. <https://doi.org/10.1038/GT.2009.103>
- Rojas, J. J., Gimenez-Alejandro, M., Gil-Hoyos, R., Cascallo, M., & Alemany, R. (2012). Improved systemic antitumor therapy with oncolytic adenoviruses by replacing the fiber shaft HSG-binding domain with RGD. *Gene Therapy*, 19(4), 453–457. <https://doi.org/10.1038/GT.2011.106>
- Rojas, J. J., Guedan, S., Searle, P. F., Martinez-Quintanilla, J., Gil-Hoyos, R., Alcayaga-Miranda, F., Cascallo, M., & Alemany, R. (2010). Minimal RB-responsive E1A Promoter Modification to Attain Potency, Selectivity, and Transgene-arming Capacity in Oncolytic Adenoviruses. *Molecular Therapy*, 18(11), 1960. <https://doi.org/10.1038/MT.2010.173>
- Rojas, L. A., Moreno, R., Calderón, H., & Alemany, R. (2016). Adenovirus coxsackie adenovirus receptor-mediated binding to human erythrocytes does not preclude systemic transduction. *Cancer Gene Therapy*, 23(12), 411–414. <https://doi.org/10.1038/CGT.2016.50>
- Rowe, W. P., Huebner, R. J., Gilmore, L. K., Parrott, R. H., & Ward, T. G. (1953). Isolation of a cytopathogenic agent from human adenoids undergoing spontaneous degeneration in tissue culture. *Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine. Society for Experimental Biology and Medicine (New York, N.Y.)*, 84(3), 570–573. <https://doi.org/10.3181/00379727-84-20714>

- Russell, W. C. (2000). Update on adenovirus and its vectors. *Journal of General Virology*, 81(11), 2573–2604. <https://doi.org/10.1099/0022-1317-81-11-2573/CITE/REFWORKS>
- Savelyeva, I., & Dobbelstein, M. (2011). Infection with E1B-mutant adenovirus stabilizes p53 but blocks p53 acetylation and activity through E1A. *Oncogene*, 30(7), 865–875. <https://doi.org/10.1038/ONC.2010.461>
- Scarsella, L., Ehrke-Schulz, E., Paulussen, M., Thal, S. C., Ehrhardt, A., & Aydin, M. (2024). Advances of Recombinant Adenoviral Vectors in Preclinical and Clinical Applications. *Viruses*, 16(3). <https://doi.org/10.3390/V16030377>
- Shalhout, S. Z., Miller, D. M., Emerick, K. S., & Kaufman, H. L. (2023). Therapy with oncolytic viruses: progress and challenges. *Nature Reviews. Clinical Oncology*, 20(3), 160–177. <https://doi.org/10.1038/S41571-022-00719-W>
- Shinoda, S., Sharma, N. S., Nakamura, N., Inoko, K., Sato-Dahlman, M., Murugan, P., Davydova, J., & Yamamoto, M. (2023). Interferon-expressing oncolytic adenovirus + chemoradiation inhibited pancreatic cancer growth in a hamster model. *Cancer Science*, 114(9), 3759–3769. <https://doi.org/10.1111/CAS.15903>
- Siurala, M., Bramante, S., Vassilev, L., Hirvonen, M., Parviainen, S., Tähtinen, S., Guse, K., Cerullo, V., Kanerva, A., Kipar, A., Vähä-Koskela, M., & Hemminki, A. (2015). Oncolytic adenovirus and doxorubicin-based chemotherapy results in synergistic antitumor activity against soft-tissue sarcoma. *International Journal of Cancer*, 136(4), 945–954. <https://doi.org/10.1002/IJC.29048>
- Stewart, P. L. (2016). Adenovirus Structure. *Adenoviral Vectors for Gene Therapy: Second Edition*, 1–26. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-800276-6.00001-2>
- Thaci, B., Ulasov, I. V., Ahmed, A. U., Ferguson, S. D., Han, Y., & Lesniak, M. S. (2012). Anti-angiogenic therapy increases intratumoral adenovirus distribution by inducing collagen degradation. *Gene Therapy* 2013 20:3, 20(3), 318–327. <https://doi.org/10.1038/gt.2012.42>
- Tian, Y., Xie, D., & Yang, L. (2022). Engineering strategies to enhance oncolytic viruses in cancer immunotherapy. *Signal Transduction and Targeted Therapy* 2022 7:1, 7(1), 1–21. <https://doi.org/10.1038/s41392-022-00951-x>
- Tollefson, A. E., Scaria, A., Hermiston, T. W., Ryerse, J. S., Wold, L. J., & Wold, W. S. (1996). The adenovirus death protein (E3-11.6K) is required at very late stages of infection for efficient cell lysis and release of adenovirus from infected cells. *Journal of Virology*, 70(4), 2296–2306. <https://doi.org/10.1128/JVI.70.4.2296-2306.1996>
- Van Den Hengel, S. K., De Vrij, J., Uil, T. G., Lamfers, M. L., Sillevius Smitt, P. A. E., & Hoeben, R. C. (2011). Truncating the i-leader open reading frame enhances release

- of human adenovirus type 5 in glioma cells. *Virology Journal*, 8. <https://doi.org/10.1186/1743-422X-8-162>
- Van Erp, E. A., Kaliberova, L. N., Kaliberov, S. A., & Curiel, D. T. (2015). Retargeted oncolytic adenovirus displaying a single variable domain of camelid heavy-chain-only antibody in a fiber protein. *Molecular Therapy Oncolytics*, 2, 15001. <https://doi.org/10.1038/MTO.2015.1>
- Villalona-Calero, M. A., Lam, E., Otterson, G. A., Zhao, W., Timmons, M., Subramaniam, D., Hade, E. M., Gill, G. M., Coffey, M., Selvaggi, G., Bertino, E., Chao, B., & Knopp, M. V. (2016). Oncolytic reovirus in combination with chemotherapy in metastatic or recurrent non-small cell lung cancer patients with KRAS-activated tumors. *Cancer*, 122(6), 875–883. <https://doi.org/10.1002/CNCR.29856>
- Virus oncolíticos: un nuevo aliado en la lucha contra el cáncer | SEBBM*. (n.d.). Retrieved August 2, 2024, from <https://sebbm.es/rincon-del-aula/virus-oncoliticos-un-nuevo-aliado-en-la-lucha-contra-el-cancer/>
- Watanabe, K., Luo, Y., Da, T., Guedan, S., Ruella, M., Scholler, J., Keith, B., Young, R. M., Engels, B., Sorsa, S., Siurala, M., Havunen, R., Tähtinen, S., Hemminki, A., & June, C. H. (2018). Pancreatic cancer therapy with combined mesothelin-redirected chimeric antigen receptor T cells and cytokine-armed oncolytic adenoviruses. *JCI Insight*, 3(7). <https://doi.org/10.1172/JCI.INSIGHT.99573>
- Watanabe, M., Nishikawaji, Y., Kawakami, H., & Kosai, K. I. (2021). Adenovirus Biology, Recombinant Adenovirus, and Adenovirus Usage in Gene Therapy. *Viruses*, 13(12). <https://doi.org/10.3390/V13122502>
- Wickham, T. J., Mathias, P., Cheresh, D. A., & Nemerow, G. R. (1993). Integrins alpha v beta 3 and alpha v beta 5 promote adenovirus internalization but not virus attachment. *Cell*, 73(2), 309–319. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(93\)90231-E](https://doi.org/10.1016/0092-8674(93)90231-E)
- Wiethoff, C. M., Wodrich, H., Gerace, L., & Nemerow, G. R. (2005). Adenovirus protein VI mediates membrane disruption following capsid disassembly. *Journal of Virology*, 79(4), 1992–2000. <https://doi.org/10.1128/JVI.79.4.1992-2000.2005>
- Wodrich, H., Guan, T., Cingolani, G., Von Seggern, D., Nemerow, G., & Gerace, L. (2003). Switch from capsid protein import to adenovirus assembly by cleavage of nuclear transport signals. *The EMBO Journal*, 22(23), 6245. <https://doi.org/10.1093/EMBOJ/CDG614>
- Wold, W. S. M., & Toth, K. (2012). Chapter three--Syrian hamster as an animal model to study oncolytic adenoviruses and to evaluate the efficacy of antiviral compounds. *Advances in Cancer Research*, 115, 69–92. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-398342-8.00003-3>

- Wolfrum, N., & Greber, U. F. (2013). Adenovirus signalling in entry. *Cellular Microbiology*, 15(1), 53–62. <https://doi.org/10.1111/CMI.12053>
- Wong, C. M., Poulin, K. L., Tong, G., Christou, C., Kennedy, M. A., Falls, T., Bell, J. C., & Parks, R. J. (2016). Adenovirus-Mediated Expression of the p14 Fusion-Associated Small Transmembrane Protein Promotes Cancer Cell Fusion and Apoptosis In Vitro but Does Not Provide Therapeutic Efficacy in a Xenograft Mouse Model of Cancer. *PLOS ONE*, 11(3), e0151516. <https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PONE.0151516>
- Xi, Q., Cuesta, R., & Schneider, R. J. (2005). Regulation of Translation by Ribosome Shunting through Phosphotyrosine-Dependent Coupling of Adenovirus Protein 100k to Viral mRNAs. *Journal of Virology*, 79(9), 5676. <https://doi.org/10.1128/JVI.79.9.5676-5683.2005>
- Xu, Z., Tian, J., Smith, J. S., & Byrnes, A. P. (2008). Clearance of adenovirus by Kupffer cells is mediated by scavenger receptors, natural antibodies, and complement. *Journal of Virology*, 82(23), 11705–11713. <https://doi.org/10.1128/JVI.01320-08>
- Yang, L., Wang, L., Su, X. Q., Wang, L., Chen, X. C., Li, D., Luo, S. T., Shi, H. S., Chen, L. J., & Wang, Y. S. (2009). Suppression of ovarian cancer growth via systemic administration with liposome-encapsulated adenovirus-encoding endostatin. *Cancer Gene Therapy* 2010 17:1, 17(1), 49–57. <https://doi.org/10.1038/cgt.2009.47>
- Yang, T. C., & Maluf, N. K. (2012). Cooperative heteroassembly of the adenoviral L4-22K and IVa2 proteins onto the viral packaging sequence DNA. *Biochemistry*, 51(7), 1357–1368. <https://doi.org/10.1021/BI201580F>
- Yang, Y., Dukhanina, O., Tang, B., Mamura, M., Letterio, J. J., MacGregor, J., Patel, S. C., Khozin, S., Liu, Z., Green, J., Anver, M. R., Merlino, G., & Wakefield, L. M. (2002). Lifetime exposure to a soluble TGF- β antagonist protects mice against metastasis without adverse side effects. *The Journal of Clinical Investigation*, 109(12), 1607–1615. <https://doi.org/10.1172/JCI15333>
- Yoo, J. Y., Kim, J. H., Kwon, Y. G., Kim, E. C., Kim, N. K., Choi, H. J., & Yun, C. O. (2007). VEGF-specific short hairpin RNA-expressing oncolytic adenovirus elicits potent inhibition of angiogenesis and tumor growth. *Molecular Therapy: The Journal of the American Society of Gene Therapy*, 15(2), 295–302. <https://doi.org/10.1038/SJ.MT.6300023>
- Yoon, A. R., Hong, J. W., Jung, B. K., Ahn, H. M., Zhang, S., & Yun, C. O. (2023). Oncolytic adenovirus as pancreatic cancer-targeted therapy: Where do we go from here? *Cancer Letters*, 579, 216456. <https://doi.org/10.1016/J.CANLET.2023.216456>
- Zafar, S., Sorsa, S., Siurala, M., Hemminki, O., Havunen, R., Cervera-Carrascon, V., Santos, J. M., Wang, H., Lieber, A., De Gruijl, T., Kanerva, A., & Hemminki, A. (2018). CD40L coding oncolytic adenovirus allows long-term survival of humanized mice

receiving dendritic cell therapy. *Oncoimmunology*, 7(10).
<https://doi.org/10.1080/2162402X.2018.1490856>

Zhang, H., Qin, L., Li, C., Jiang, J., Sun, L., Zhao, X., & Li, N. (2019). Adenovirus-mediated herpes simplex virus thymidine kinase gene therapy combined with ganciclovir induces hepatoma cell apoptosis. *Experimental and Therapeutic Medicine*, 17(3), 1649.
<https://doi.org/10.3892/ETM.2019.7147>

Zhang, J., Kale, V., & Chen, M. (2015). Gene-directed enzyme prodrug therapy. *The AAPS Journal*, 17(1), 102–110. <https://doi.org/10.1208/S12248-014-9675-7>

Zhang, Y., & Bergelson, J. M. (2005). Adenovirus Receptors. *Journal of Virology*, 79(19), 12125. <https://doi.org/10.1128/JVI.79.19.12125-12131.2005>

Zhang, Y., Li, Y., Chen, K., Qian, L., & Wang, P. (2022). Oncolytic virotherapy against the tumor microenvironment and its potential in pancreatic cancer. *Journal of Cancer Research and Therapeutics*, 18(5), 1247–1255.
https://doi.org/10.4103/JCRT.JCRT_91_21

ANNEXOS

ANNEX 1

FORMULARI SOL·LICITUD DEL TREBALL DE FI DE GRAU

(A lliurar per correu electrònic al responsable de l'assignatura)

Alumne (Nom/Cognoms): *(omplir camp)*

Correu-e *(omplir camp)*

Marina Boj Morillo

marina.boj@estudiants.urv.cat

Títol provisional *(omplir camp)*

L'ús d'adenovirus oncolítics com a teràpia contra el càncer pancreàtic.

Resum del treball *(omplir camp)*

El grup de recerca de Teràpia gènica i Càncer de l'IDIBAPS, amb el qual treballaré aquest quadrimestre, ha desenvolupat dissenys d'adenovirus oncolítics que presenten una elevada selectivitat per als tumors pancreàtics i una replicació millorada, demostrant la seva capacitat anticancerosa en xenoinjerts derivats de pacients (PDX). Actualment estan estudiant com manipular els virus per tal de permetre una eficient administració intravascular, la disseminació intratumoral i la participació del sistema immunitari de l'hoste per a generar teràpies més eficients per a tumors primaris i metastàtics.

Signatura del Alumne/a *(escanejades o digitals)*



Normativa de Treball Fi de Grau Facultat d'Enologia
Aprovada per Junta de Facultat d'Enologia del dia 30 d'octubre de 2014

Tarragona a ___24___ de _____ Gener _____ 2024 ___

ANNEX 2

FITXA DE SEGUIMENT DEL TUTOR/A del TFG

Nom i Cognoms de l'Alumne/a: Marina Boj Morillo

Nom i Cognoms del Tutor/a: Ana Fernández Bravo

Data de la entrevista amb l'alumne: 16/04/2024; 03/08/2024; 22/08/2024

Recomanacions durant el seguiment: Les recomanacions donades a l'alumna han estat les següents: i)

Recerca de articles rellevants relacionats amb el tema de treball. ii) Seguiment mitjançant correu electrònic amb la tutora per comentar dubtes. iii) Organització a l'hora de fer els diferents apartats del treball.

Observacions: L'alumna ha realitzat un bon treball durant aquest temps i es va posar en contacte amb mi per a rebre consells. L'alumna ha demostrat ser una bona treballadora en base a la qualitat del seu treball i crec que podrà tindre un gran futur en la ciència

Observacions Darrera revisió: En base a tot el comentat anteriorment, crec que Marina ha realitzat un bon treball i ha superat les expectatives establertes

Signatura del Tutor/a

Signatura del Alumne/a



Ana Fernández
Bravo

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI 2024.08.23
13:16:10 +02'00'

Firmado digitalmente por
Marina Boj Morillo - DNI:
39955292Z el día
23/08/2024.

Tarragona a 23 de Agost 2024