

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM GENÉTICA E BIOLOGIA MOLECULAR
INSTITUTO DE BIOCÊNCIAS - DEPARTAMENTO DE GENÉTICA

***In Silico* assembly of a chimeric receptor for oncolytic adenoviruses**

Eduardo Cheuiche Antonio

Dissertação apresentada ao curso de Mestrado em Genética e Biologia Molecular, ofertado pela Universidade Federal do Rio Grande do Sul como requisito para obtenção do título de Mestre em Genética e Biologia Molecular.

Orientador

Prof. Dr. Gustavo Fioravanti Vieira

Porto Alegre

Outubro de 2023

Instituições Financiadoras

Este trabalho foi desenvolvido no Núcleo de Bioinformática do Laboratório de Imunogenética. O trabalho constitui o tema de dissertação de mestrado pelo Programa de Pós-Graduação em Genética e Biologia Molecular da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS) e teve apoio do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), Ministério da Ciência, Tecnologia e Inovação (MCTI). O aluno recebeu auxílio financeiro por meio de uma bolsa concedida pelo CNPq, vinculada ao Programa de Pós-Graduação em Genética e Biologia Molecular da UFRGS.

Agradecimentos

Aos membros do laboratório de imuno informática que sempre estiveram à disposição caso eu necessitasse, não somente com o trabalho mas também servindo como apoio e incentivo.

Ao professor Gustavo Fioravanti Vieira, que ajudou pessoalmente em diversas etapas do trabalho e auxiliou em diversas escolhas de testes e experimentos que enriqueceram o trabalho como um todo. Também por apoiar o desenvolvimento de uma nova linha dentro do laboratório para acomodar este novo projeto que eu trouxe para desenvolver durante o período do mestrado.

Aos professores da pós-graduação pelos ensinamentos tanto antes quanto depois do período da pandemia.

Aos familiares e amigos que vivenciaram este período da minha carreira em meio a diversas tribulações, incluindo a pandemia que mudou totalmente o rumo de diversas pessoas.

Aos funcionários administrativos, em especial ao Elmo Cardoso, que foi essencial em auxiliar em todos os aspectos burocráticos do mestrado e auxiliou em toda e qualquer necessidade que eu possa ter tido, desde problemas com inscrições até em ajudar na publicação do meu primeiro artigo científico.

Sumário

RESUMO.....	6
ABSTRACT.....	7
LISTA DE FIGURAS.....	8
1. INTRODUÇÃO.....	9
1.2. Conhecendo o seu inimigo: Câncer.....	9
1.3. Uma breve história dos novos tratamentos contra o câncer.....	10
1.4. Virologia no Câncer: O uso de Adenovírus contra o Glioblastoma.....	11
1.5. Engenharia viral e biologia sintética.....	13
1.6. Ferramentas <i>in silico</i> na engenharia viral.....	15
2. JUSTIFICATIVA.....	16
3. OBJETIVOS.....	16
3.1. Objetivo Geral.....	16
3.2. Objetivos específicos.....	16
4. ARTIGO ORIGINAL.....	18
Abstract.....	18
Introduction.....	19
Methodology.....	25
Discussion and concluding remarks.....	28
References.....	31
5. CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	34

6. PERSPECTIVAS.....	35
7. REFERÊNCIAS.....	36

Resumo

Nos últimos anos, os tratamentos para neoplasias reconhecidos como a atual fronteira da inovação são as terapias de inibição de *checkpoint* imune e terapias utilizando células T com receptores quiméricos (também conhecidos como CAR-T). Essas duas tecnologias abrangem o campo conhecido como imunoterapia, técnicas voltadas para aumentar a eficiência do sistema imune do corpo de maneira artificial, de maneira a tornar a resposta imune contra o câncer mais eficiente. Os estudos mais recentes na área da oncologia envolvem a combinação destas novas terapias inovadoras com terapias mais clássicas, como por exemplo, a utilização dos inibidores de *checkpoint* anti-PDL1 em conjunto com quimioterápicos e/ou radioterapia. O rápido avanço tecnológico nas áreas da biologia molecular e genética permitiu não só o desenvolvimento das imunoterapias como uma efetiva forma de tratamento, como também facilitou o melhoramento de outras alternativas terapêuticas, como por exemplo a viroterapia. O uso de vírus para tratar neoplasias não é uma ideia nova, porém devido às limitações tecnológicas da época, sua efetividade era pequena demais para justificar sua implementação. Nos últimos anos, entretanto, houveram casos de alguns vírus geneticamente modificados sendo aprovados para o tratamento do câncer, mostrando que a tecnologia está chegando em um nível capaz de ser uma opção terapêutica viável. O advento de tecnologias que facilitam cada vez mais a alteração genética de vírus abre um leque de quase infinitas opções de como um vírus pode ser programado para combater o câncer; e neste trabalho será aprofundado no nível teórico sobre como montar um vírus oncolítico e como a utilização de ferramentas *in silico* podem auxiliar este processo. Ao longo deste trabalho, conseguimos construir dois modelos baseados em dados de cristalografia para servir como uma prova de conceito de como é possível construir este receptor altamente customizável usando apenas dados de sequência e, ao longo de diversas análises diferentes, conseguimos observar em nossos modelos diversas características que pertencem a um receptor molecular robusto, estável e funcional.

Palavras-Chave: Vírus Oncolítico, Bioinformática, Imunologia, Biologia Sintética.

Abstract

In recent years, the treatments for cancer recognized as state-of-the-art are immune checkpoint inhibition therapies and therapies using T cells with chimeric receptors (also known as CAR-T). These technologies belong to the field known as immunotherapies, techniques that artificially augment the body's immune system in order to make the immune response against cancer more efficient. The latest clinical trials involving the treatment of several cancers usually involve the combined application of different types of immunotherapies in conjunction with more classical approaches such as radiation and/or chemotherapy. This field was able to grow in such a way due to a rapid technological advance in the areas of molecular biology and genetics, which also allowed the improvement of other therapeutic alternatives, such as virotherapy. The use of viruses to treat cancer is not a new concept, but due to the technological limitations of the time, its effectiveness was too small to justify its implementation. The advent of technologies that facilitate genetic editing of viruses opens up an almost infinite number of options for how a virus can be programmed to treat cancer; and this work will take a dive at the theoretical level on how to assemble an oncolytic virus receptor and how the use of *in silico* tools can assist in the makings of this biological blueprint of a weapon designed to fight cancer. Throughout this work, we managed to built two models based on crystallography data to serve as a proof of concept on how it is possible to construct this highly customizable receptor using only sequence data and, over the course of several different analysis, managed to display characteristics that belong to a robust, stable and functional molecular receptor.

Lista de Figuras

Figura 1. Um esquema representando as atuais terapias utilizadas no tratamento de câncer.....	11
Figura 2. O mecanismo de ação de como um vírus oncolítico funciona.....	13
Figura 3. Esquema de um modelo de vírus oncolítico.....	15

1. Introdução

1.2. Conhecendo o seu inimigo: Câncer

O processo de carcinogênese requer um número de alterações genéticas em um grupo de células para que possam se tornar um tumor maligno de fato: elas precisam sustentar sinais de proliferação constante e concomitantemente com a ativação da imortalidade replicativa, isso com a finalidade de sustentar um constante processo mitótico e crescer indefinidamente; é necessário também inibir os mecanismos supressores de crescimento celular e resistir aos fatores intrínsecos e extrínsecos que desencadeiam a apoptose, a fim de sobreviver às tentativas do corpo de controlar o crescimento anormal que ocorre em tumores; é necessário ativar o processo de angiogênese, para que o câncer possa extrair mais oxigênio e nutrientes e talvez providenciar uma nova forma de invadir outros órgãos e, finalmente, o câncer maligno tem que produzir células capazes de suportar todo o processo de metástase, o que inclui sobreviver a viagens no interior dos vasos sanguíneos ou vasos linfáticos e uma vez que cheguem a outro órgão, as células neoplásicas precisam ser capazes de crescer no novo tecido (Hanahan and Weinberg 2011). O elevado grau de proliferação combinado com um aumento na taxa de mutações tornam o câncer uma doença altamente heterogênea e com uma excepcional capacidade de adaptação, pois mesmo em frente a quimioterápicos altamente citotóxicos, existe a possibilidade de uma certa população celular do tumor sobreviver devido a uma alteração genética pré-existente ou até mesmo desenvolver um mecanismo de resistência ao longo do período de tratamento, algumas alterações conhecidas incluem a exportação de agentes quimioterápicos através de bombas ATP dependentes para fora do interior celular, inativação metabólica, geração de mecanismos anti-apoptóticos e alterações conformacionais em sítios ativos das proteínas alvo (Hanahan and Weinberg 2011; Nussinov et al. 2021). Uma doença de tamanha heterogeneidade e resistência como o câncer representa um dos maiores obstáculos da medicina moderna, sendo a segunda principal causa de morte em todo o mundo, com novos casos diagnosticados em uma frequência cada vez maior (Ahmad et al. 2022).

1.3. Uma breve história dos novos tratamentos contra o câncer

Nos últimos anos, muitos avanços ocorreram no campo de pesquisa do câncer, principalmente no desenvolvimento de novas formas de tratamento que incluem técnicas novas que vão além dos clássicos agentes quimioterápicos e da radioterapia (**Figura 1**). A terapia molecular, como por exemplo o anti-HER-2, é um grande exemplo de como terapias de precisão podem ter um efeito considerável e eficiente sem as desvantagens tóxicas da quimioterapia, tendo como sua única desvantagem o fato de que nem todos os tumores têm alvos específicos que podem ser explorados para tal uso (Yu et al. 2017; Hou et al. 2022). Mais recentemente, avanços foram feitos no campo conhecido como imunoterapia ou como inibição de *checkpoint* imune, com seus representantes mais distintos sendo as terapias anti CTLA-4 e PD-L1, que removem as inibições que o câncer impõe ao sistema imunológico e permitem uma atividade prolongada e mais eficiente do sistema imunológico (Buchbinder and Desai 2016). Muitos tumores, infelizmente, possuem características que diminuem de maneira significativa o potencial terapêutico dos bloqueadores de *checkpoint* imune, estas características que compõem um tumor “frio”. Tumores que apresentam características como falta de alvos imunogênicos como neoantígenos tumorais, apresentação defeituosa de antígenos, falta de infiltração de células imunes no ambiente tumoral e um acentuado nível de células T sendo desativadas e/ou mortas são considerados imunologicamente frios, um tecido neoplásico caracterizado pela presença de um ambiente que dificulta severamente a habilidade do sistema imune em eliminar o tecido tumoral, mesmo com a utilização de imunoterapias (Barrueto et al. 2020; Zhang et al. 2022). Ainda no campo de terapias inovadoras utilizando o sistema imune como base, existe a terapia com células CAR-T (*chimeric antigen receptor*), que são células T geneticamente modificadas para expressar um receptor de antígeno quimérico derivado de um anticorpo que é fundido ao domínio transmembrana do receptor da célula T (TCR). Quando os antígenos tumorais são reconhecidos pelo CAR-T, ele desencadeia a cascata de ativação das células T, resultando em sua proliferação e atividade citotóxica para lisar a célula alvo (Filley et al. 2018). A terapia de CAR-T não é isenta de desvantagens, com um bom número de casos relatados de reações autoimunes e alguns casos de neurotoxicidade que podem ser letais (Zahid et al. 2020). As limitações apresentadas pelas terapias atuais

traz em evidência a necessidade de novas e mais eficientes formas de terapias, utilizando combinações de terapias anteriores para um melhor efeito ou até mesmo a criação de novas abordagens para lidar com este complexo desafio.

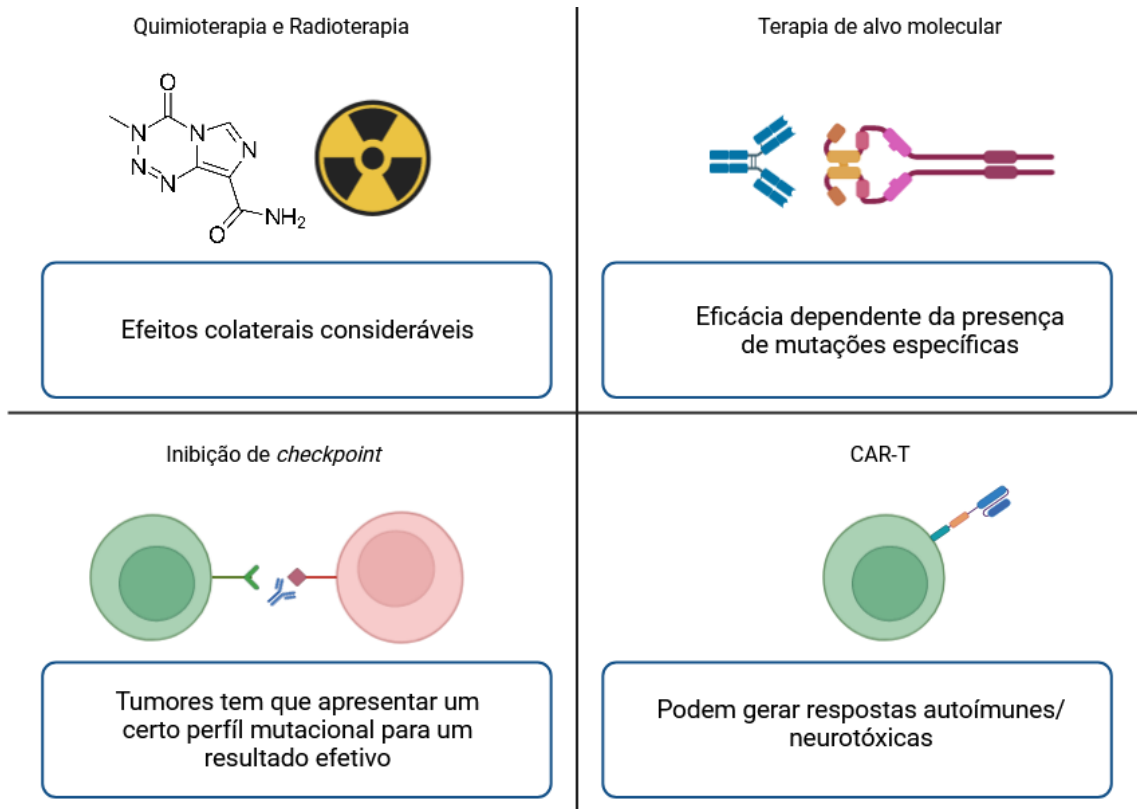


Figura 1. Um esquema representando as atuais terapias utilizadas no tratamento de câncer na atualidade junto com uma breve descrição de limitações ou efeitos colaterais que tais técnicas possuem. Imagem criada utilizando o BioRender.

1.4. Virologia no Câncer: O uso de Adenovírus contra o Glioblastoma

Nos últimos anos, uma estratégia conhecida como viroterapia, ou terapia com vírus oncolítico, vem crescendo e ganhando mais notoriedade. A viroterapia consiste no uso de um vírus modificado geneticamente para matar de maneira específica o tecido tumoral (**Figura 2**) (Kemp et al. 2020). Apesar de parecer uma tecnologia mais recente devido a aparente necessidade de controlar de maneira precisa alguns genes virais, ela vem sendo estudada e moderadamente

experimentada desde o século passado (Alberts et al. 2018). Apesar da longa história que a terapia viral possui, foi após um grande evento que houve uma nova onda de investimentos no tópico, que foi a aprovação regulatória do Herpesvírus Talimogene Laherparepvec (T-VEC), pelo FDA (*Food and Drug Administration*) que acabou por gerar um interesse significativo no desenvolvimento de novos vírus oncolíticos, tanto para uso em monoterapia quanto como em tratamentos combinados para diversos tipos de cânceres humanos (Bommareddy et al. 2017). Enquanto o Herpes foi o primeiro vírus a ser aprovado, diversos outros vírus estão sendo testados para determinar sua capacidade de ser um eficiente agente oncolítico. Os adenovírus, um outro possível candidato, são vírus não envelopados com simetria icosaédrica cujo genoma é composto por DNA não segmentado linear de fita dupla medindo aproximadamente 35 kb. Os atrativos do modelo adenoviral incluem o fato de que o vírus é bem conhecido e tem sido utilizado para outras aplicações no campo da manipulação gênica, onde o vírus atua como vetor para a terapia. Como cada tipo de câncer possui diferentes padrões de expressão de receptores extracelulares e possuem diferentes rotas moleculares alteradas, se faz necessário a escolha de um modelo para basear o design do vírus. A escolha do Glioblastoma Multiforme (GBM) como modelo é devida a suas características peculiares que incluem sua natureza agressiva e invasiva, resistência à terapia padrão, alta capacidades imunossupressoras e de prognóstico pobre com o tempo médio de sobrevivência de 15 meses. Todos esses fatores tornam o Glioblastoma não só um bom candidato para testar uma nova metodologia que não depende somente de agentes químicos ou do sistema imunológico, como também um alvo de alta prioridade para a medicina moderna devido a falta de opções terapêuticas efetivas (Nduom et al. 2015; Kiyokawa and Wakimoto 2019).

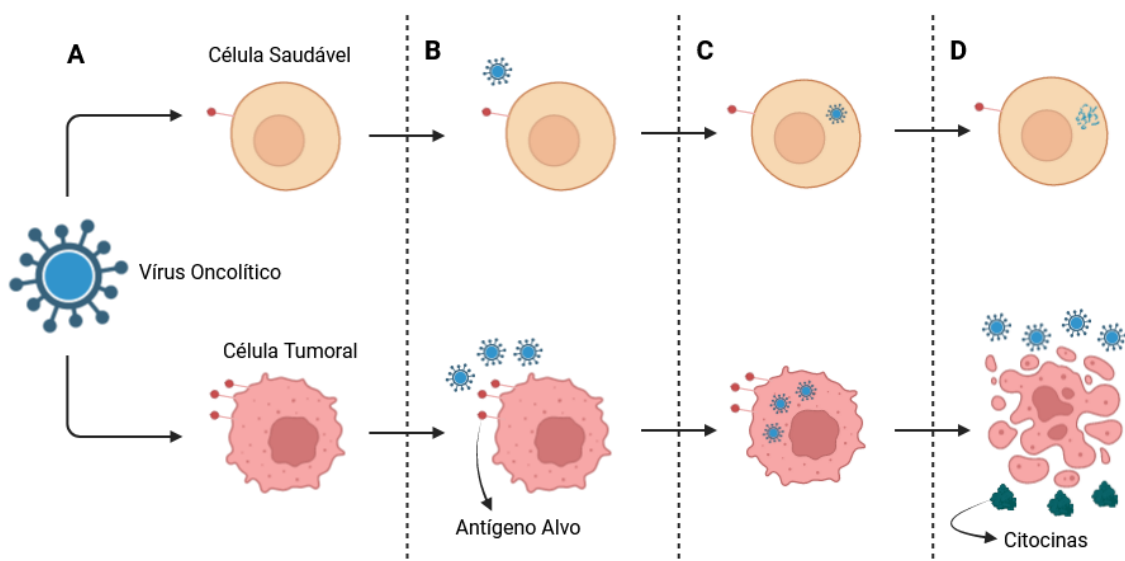


Figura 2. O mecanismo de ação de como um vírus oncolítico funciona pode ser dividido de maneira simplificada em 4 etapas. A introdução do vírus no sistema, onde ele irá se deparar com a população de células tumorais e células normais (A). A interação com os antígenos alvo de interesse (B); são escolhidos antígenos que são unicamente expressos ou são consideravelmente mais expressos em células cancerígenas do que em tecido saudável. A replicação viral (C) que ocorre preferencialmente em células tumorais. A última etapa (D) envolve a lise da célula tumoral, liberando partículas virais que infectam outras células tumorais adjacentes e a liberação de citocinas que podem ser adicionadas ao código genético do vírus oncolítico para aumentar a ação imune sobre o câncer. Em células normais, devido ao funcionamento normal de genes de proteção, o vírus não consegue se replicar facilmente e é eliminado na maioria dos casos sem causar danos. Imagem feita utilizando o BioRender.

1.5. Engenharia viral e biologia sintética

O processo de criação de um vírus oncolítico envolve o controle, modificação e/ou alteração de três aspectos da partícula viral, sendo eles: o tropismo celular, a segurança para o tecido saudável e qual gene o vírus carregará em seu genoma para auxiliar no processo de combate ao tumor. As duas primeiras características são de suma importância enquanto a última vem sendo aplicada em vírus oncolíticos de novas gerações (Figura 3). No modelo adenoviral, a solução clássica para deixar o vírus mais seguro para o tecido saudável é a deleção de um segmento do gene E1A para tornar a replicação do adenovírus seletiva ao

tecido tumoral. Alguns grupos optaram por uma estratégia mais refinada como por exemplo o trabalho publicado em 2019 por Huang et al., onde um circuito genético foi projetado de maneira compacta (<8,5 kb) e programável para controlar a replicação viral. Em seu trabalho, um estipulado promotor específico de câncer é colocado para controlar a expressão de E1A, quando este promotor encontra a região alvo ele pode ser reprimido na presença de um microRNA expresso em altos níveis em células normais, mas em um nível baixo em células cancerígenas; e pode ser ativado na presença de um microRNA específico do câncer, assim o circuito sensorial controla os níveis de E1A (Sauthoff et al. 2004; Maroun et al. 2017; Huang et al. 2019).

Outro aspecto importante em um vírus oncolítico é garantir que ele atue na área de interesse, então é de suma importância que seus receptores tenham um tropismo acentuado contra o tecido tumoral. Naturalmente, os adenovírus utilizam o receptor CAR (coxsackievirus and adenovirus receptor), que normalmente desempenha um papel na adesão celular, para infectar seus alvos. Devido à alta variabilidade tecidual tanto inter como intra-tumoral da presença de tal receptor, existe a necessidade de melhorar tal receptor através de mudanças genéticas para torná-lo mais infeccioso contra os alvos de interesse. Existem diversos meios de alcançar tal objetivo, neste trabalho focamos na estratégia que foi explorada por Krasnykh et al. em 2001, que envolve substituir os domínios da extrema-ponta do receptor e parte do eixo da proteína de fibra do adenovírus tipo 5 por um domínio de trimerização de fibritina altamente estável do bacteriófago T4, que tem uma semelhança estrutural com a fibra Ad5 e não possui atividade intrínseca de ligação. A estabilidade da estrutura e a falta de porções responsáveis por ligação permitem acoplar ligantes de proteína ou anticorpos de cadeia única na porção terminal C da fibritina utilizando um espaçador peptídico curto (Krasnykh et al. 2001; Stepanenko and Chekhonin 2018).

Uma outra forma que diversos grupos vêm experimentando para melhorar a atividade oncolítica dos vírus é através da adição de transgenes no genoma viral. A adição desses elementos muitas vezes são realizadas com o objetivo de modular a atividade do sistema imune para obter uma resposta mais efetiva contra o câncer; algumas moléculas já utilizadas em adenovirus incluem: O fator estimulante de colônias de granulócitos-macrófagos (GM-CSF), um fator de crescimento e ativação de células mielóides que também estimula a apresentação

de antígenos pelas células apresentadoras de antígeno (APC); Interleucina 2 (IL-2), que atua como um fator de crescimento e ativação para células CD8+ e Natural Killers (NK); e Interleucina 12 (IL-12), uma citocina pró-inflamatória que aumenta a liberação de Interferon-gama (IFN- γ), e ativa as células Th1, estas associadas à conexão entre as respostas imunes adaptativa e inata, e células NK. Existe ainda uma infinidade de genes que estão sendo testados para expressão em vírus oncolíticos, tanto para estudar a eficiência individual de cada um, como para saber os riscos que acarretam a adição destas sequências no genoma viral, pois alguns destes produtos gênicos podem ter reações indesejadas ou até mesmo tóxicas dependendo do seu nível de expressão (Gryciuk et al. 2023).

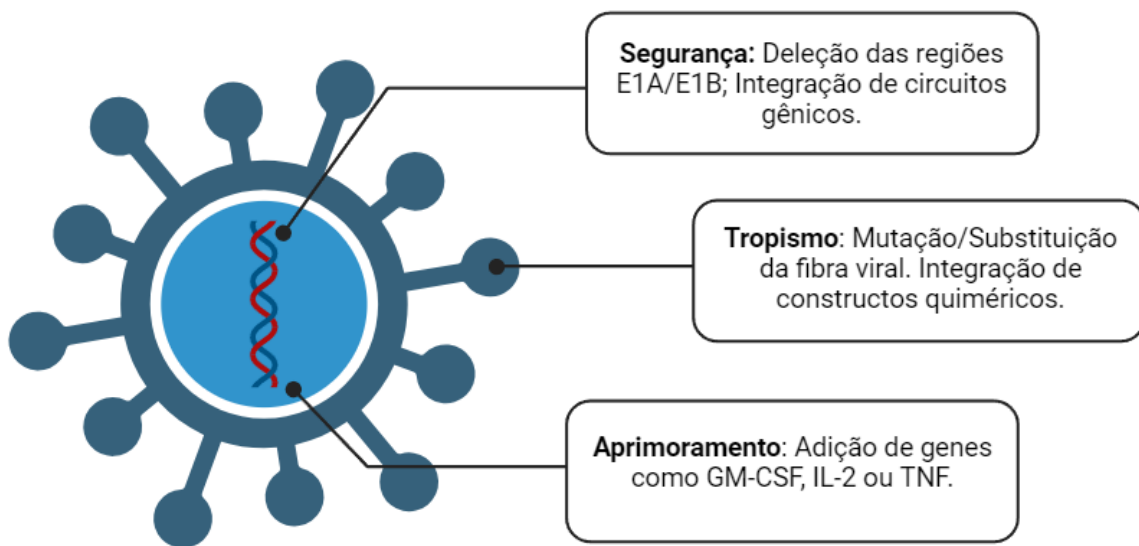


Figura 3: Esquema de um modelo de vírus oncolítico, citando e exemplificando as alterações necessárias para seu uso eficiente contra o câncer: segurança, tropismo e aprimoramento. Imagem original, feita no BioRender.

1.6. Ferramentas *in silico* na engenharia viral

O crescente número de dados gerados nos últimos anos abriu e expandiu os horizontes de possíveis terapias, alvos moleculares exploráveis e elucidou mecanismos tumorais. Não foi, entretanto, somente o progresso no campo

biológico que auxiliou o desenvolvimento de novas estratégias terapêuticas, mas o avanço concomitante do poder de processamento computacional. Avanços nas ciências da computação permitiram a implementação do design assistido por computador em diversas terapias, incluindo a terapia viral. O design assistido por computador nada mais é que uma integração de métodos como biologia de sistemas, modelagem molecular e redes neurais para analisar grandes volumes de dados, gerar modelos preditivos e testar em um ambiente virtual os possíveis candidatos para estudos posteriores (Lathwal et al. 2020).

2. Justificativa

O design de vírus oncolítico permanece um campo cheio de possibilidades a serem exploradas. Em conjunto com diversos estudos clínicos, o uso e integração de métodos computacionais auxilia na otimização destes novos modelos terapêuticos através de análises de grandes volumes de dados e uso de ferramentas preditivas. Neste trabalho específico, o foco é extrair o maior número de dados de uma estrutura quimérica para identificar possíveis oportunidades de otimização e possivelmente desenvolver protocolos para a geração de mais receptores melhorados para o uso em vírus oncolítico. Esses dados podem auxiliar diversos grupos que querem tanto otimizar seu receptor modelo, quanto fazer o design inicial de um receptor específico para uma molécula alvo de interesse.

3. Objetivos

3.1. Objetivo Geral

Construir utilizando dados estruturais depositados em repertórios digitais um receptor quimérico pertencente a um hipotético vírus oncolítico.

3.2. Objetivos específicos

1. Analisar dados de estabilidade da estrutura, também como o comportamento da mesma ao longo do tempo em um ambiente aquoso.
2. Avaliar como o modelo *in silico* se comporta, e se os resultados observados durante os testes condizem com a literatura atual.
3. Avaliar se o componente ligante mantém sua capacidade de ligação ao ser incorporado em uma estrutura complexa.
4. Identificação de quais propriedades chave podem servir para definir qualitativamente se um receptor é estável ou não.
5. Coletar os dados produzidos durante os experimentos para servirem como guias gerais para avaliar a qualidade geral de um receptor quimérico *in silico* e classificá-lo como um modelo otimizado ou não.

4. ARTIGO ORIGINAL

In Silico assembly of a chimeric receptor for experimental oncolytic adenoviruses

Eduardo Cheuiche Antonio (1), Gustavo Fioravanti Vieira(1).

(1) Programa de pós-graduação em genética e biologia molecular, Universidade Federal do Rio Grande do Sul.

Abstract

In recent years, the treatments for cancer recognized as state-of-the-art are immune checkpoint inhibition therapies and therapies using T cells with chimeric receptors (also known as CAR-T). These technologies belong to the field known as immunotherapies, techniques that artificially augment the body's immune system in order to make the immune response against cancer more efficient. The latest clinical trials involving the treatment of several cancers usually involve the combined application of different types of immunotherapies in conjunction with more classical approaches such as radiation and/or chemotherapy. This field was able to grow in such a way due to a rapid technological advance in the areas of molecular biology and genetics, which also allowed the improvement of other therapeutic alternatives, such as virotherapy. The use of viruses for cancer therapy is not a new concept, and thanks to the advent of technologies that facilitate the genetic editing of viruses, it opened an almost infinite number of options on how a virus can be programmed to treat cancer; and in this work will take a dive at the theoretical level on how to assemble an oncolytic virus receptor and how the use of *in silico* tools can assist in the makings of this biological blueprint of a weapon designed to fight cancer. Throughout this work, we managed to built two models based on crystallography data to serve as a proof of concept on how it is possible to construct this highly customizable receptor using only sequence data and, over the course of several different analysis, managed to display characteristics that belong to a robust, stable and functional receptor.

Keywords: Oncolytic Virus, Bioinformatics, Immunology, Synthetic Biology.

Introduction

The oncolytic virus therapy, or virotherapy, can be summarized in the use of natural or genetically modified viruses to specifically destroy cancer cells while maintaining damage to normal tissue at minimum. The use of viruses in the field of oncology has been studied and moderately experimented with since the last century, and the event that drove a new surge of interest in the topic was the regulatory approval of the Herpesvirus Talimogene Laherparepvec, or T-VEC, by the FDA (Food and Drug Administration). The increased interest in oncolytic virus therapy generated several new experimental viruses both for use in monotherapy and in combination treatments for several types of human cancers (1–4). Among the many candidates of possible viruses to be used for oncolytic virus therapy, the human adenoviruses (ADs) are prime candidates due to their high flexibility to various genetic modifications and for having a biology that has been thoroughly studied. The knowledge of how adenoviruses work facilitates enormously the genetic manipulation of the virus for clinical and experimental applications. Adenoviruses also have the added benefit of being able to be produced at high quantity while also possessing a good stability (5,6). The process of creating an oncolytic virus involves the artificial modification of key aspects of the viral particle like the cell tropism; the addition of safety mechanisms to preserve the healthy tissue; and can also include the addition of transgenes to assist the virus in either enhancing its cytopathic effect or recruiting the immune system to the local area (7). In the subject of safety for an adenoviral model, an effective and explored way to make the virus safer for healthy tissue is the deletion of a segment of the *E1A* gene; the E1A protein is capable of binding in the retinoblastoma protein (Rb), which regulates the release of the transcription factor E2F. The binding of E1A to Rb and consequent release of E2F leads the cell to S phase, which is a necessary condition for proper viral replication. Through a genetic deletion or modification that impairs the binding of the E1A protein, it is possible to make the adenovirus replication selective for tumor tissue containing a defective Rb pathway. Some groups opted for a more refined strategy by utilizing engineering principles to develop a biological sensory switch system, such as the one published in 2019 by

Huang et al., where a genetic circuit was designed in a compact (<8.5 kb) and programmable way to control viral replication. In their work, a specific cancer-specific promoter is placed to control the expression of E1A, when this promoter finds the target region it can be repressed in the presence of a microRNA expressed at high levels in normal cells, but at a low level in cells carcinogenic; and can be activated in the presence of a cancer-specific microRNA, so the sensory circuit controls E1A levels (8,9). To further the effectiveness of the oncolytic virus, several groups have been trying to improve their functionality through the addition of transgenes in the viral genome. The addition of these elements is often carried out with the aim of modulating the activity of the immune system to obtain a more effective response against cancer; some molecules already used in adenoviruses include: Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor (GM-CSF), a myeloid cell growth and activation factor that stimulates antigen presentation by antigen presenting cells (APCs); Interleukin 2 (IL-2), which acts as a growth and activation factor for CD8+ cells and Natural Killers (NK); and Interleukin 12 (IL-12), a pro-inflammatory cytokine that increases the release of Interferon-gamma (IFN- γ), and activates Th1 cells, which are associated with the connection between the adaptive and innate immune responses, as well as NK cells. There is still an infinitude of genes that are being tested for expression in oncolytic viruses, both to study the individual efficiency of each one, and to know the risks that entail the addition of these sequences in the viral genome, since some of these gene products may have unwanted or even toxic reactions depending on their level of expression (6). The final key aspect that oncolytic viruses need in their design and the focus of this current work is the appropriate tropism to the tissue of interest, so it is of the utmost importance that the viral receptors have an appropriate affinity against the tumor tissue. Naturally, adenoviruses use the coxsackievirus and adenovirus receptor (CAR), a molecule involved in the process of cell adhesion, to infect their targets. CAR is expressed differentially in almost all organs and there is a considerable variation, both inter and intra-tumoral in the presence of such a receptor. The facts that CAR plays a pivotal role in binding to the cell of interest surface and that its main target possess such high variation in expression, it arises the need to utilize genetic modifications to improve the virus infectivity against tissues of interest by altering the natural tropism of the receptor to a more suitable

molecule. There are several ways to achieve this goal, in this work we focus on the strategy that was explored by Krasnykh et al. in 2001, which involves replacing the receptor knob domains and part of the fiber protein shaft of adenovirus type 5 (Ad5) with a highly stable fibritin trimerization domain from bacteriophage T4, which has a structural similarity to the Ad5 fiber and does not have intrinsic binding activity. The structure's improved stability allows coupling of single-chain protein, antibody linkers to the C-terminal portion of fibritin using a short peptide linker or cancer specific peptides to target specific cell types (10–12).

Prominent characteristics of the adenoviral model

Human adenoviruses are non-enveloped DNA viruses, with a linear double-stranded genome of approximately 34 to 39 kilobases (kb), capable of infecting a large plethora of human cells including liver, renal and respiratory tract cells. The adenovirus particle has an icosahedral symmetry with a capsid diameter around 150 nanometers (nm); the main components of the capsid are the hexons, pentons and fibers. The adenovirus genes can be separated into early and late genes, which refers to what phase of the viral cycle they belong; the early genes (E1A, E1B, E2, E3, E4) are the ones responsible for initial protein synthesis and replication of the viral genome, while the late genes (L1–L5) control the assembly of the capsid components for new viral particles and the release of the new progeny after triggering the cell death (6,13). Adenoviruses can be divided into seven species referenced by the letters A to G, with several subtypes already reported. The serotypes in Species C are the most common, and often cause moderate or weak infections during early childhood (12,14). The choice of using the adenoviral model for oncolytic virus therapy hails from the same basis as why adenoviruses are also prime choices for gene therapy: their genome and proteins are well studied, they can be easily grown in high titer, and they can also infect non-dividing and dividing cells without very specific regards with the invaded cell type. While gene therapy employs both replicant deficient and replicant competent viral particles, oncolytic virus therapy uses the latter more prominently (15). The adenoviral infection causes a high cytotoxic effect which is an important issue when used as a gene vector; however, it becomes an advantageous

characteristic when used as an oncolytic virus since the elimination of the neoplastic tissue is the desired outcome of virotherapy (16).

Glioblastoma: Both an initial target and a lasting issue

Glioblastoma (GBM) is a very aggressive neoplasia with a 5-year overall survival (OS) rate and with few truly curative options. GBM also possesses incredible resistance against several therapeutic options, being able to recur within the border region of the original tumor after surgical resection followed by radiotherapy and/or chemotherapy (17,18). The plethora of defense mechanisms employed by the tumor, which includes drug inactivation/efflux, enhanced DNA damage repair and inhibition of cell death mechanisms make it exceptionally difficult to eliminate the GBM cancer cells; the issue is further intensified due to the blood-brain barrier restricting drug delivery to the local (19,20). The increasing reports of how oncolytic viruses could be leveraged to improve clinical outcomes and the fact that GBM possesses both a poor prognosis and lack of effective treatment options made several researchers investigate how the use of virotherapy could fare against this problematic and resilient tumor. Several tests and researches in the topic were conducted and wielded interesting results with a multitude of viruses being tested, including the adenovirus model DNX-2401, which showed great potential for this treatment option due to the results of the phase I study revealing an effective response most likely due to the oncolytic viral action and the activation of anti-tumor immunity on site (21–23).

Computer-aided designing in viral engineering

Advances in computer science have allowed the implementation of Computer-Aided Design (CAD) in several therapies, including viral therapy. CAD is nothing more than an integration of methods such as systems biology, molecular modeling and neural networks to analyze large volumes of data, generate predictive models and test potential candidates for further studies in a virtual environment (24). When it comes to the application of this methodology to the target interest of this project, we first accessed what data was already available.

Due to the increased popularity of oncolytic virotherapy, several research groups have their own designs for their viruses in regards to safety, tropism and transgene addition. That translates to having *in vitro* experimental data of several models for the fiber xenotyping model, which includes the data from Matsui et al. where a monobody targeting EGFR or VEGFR2 was fused in the fiber protein terminus of the segment belonging to the T4 phage and showed the capacity to specifically transduce the targeted cells (25). In 2014, instead of using a monobody for the targeting mechanism, Kaliberov et al. utilized an unusual antibody derived from animals in the camelid family that consist of only the two heavy-chains to direct the virus towards human Carcinoembryonic Antigen (CEA), a glycoprotein overexpressed in several types of human cancers (26). Finally, O'Bryan et al. utilizing the same base structure of adenoviral shaft fused with fibritin and knob domain from the T4 bacteriophage, employed the ligand molecule CXCL12 to the structure in order to target CXCR4 and CXCR7, which both receptors are related to the metastasis process of breast cancer (27). The common feature of each model previously cited is the use of the same molecular structure originated from the fusion of the adenovirus fiber shaft with the bacteriophage T4 fibritin domain, with the key difference being the molecule added in the C-terminus portion of the protein to direct the viral tropism towards specific targets (Figure 1). While the sequence of each oncolytic virus receptor has been well documented, as well as the methodology and results, we still lacked data in regards to the 3D structure of the chimeric receptor itself. This created a curious scenario where there is a great amount of data indicating that the chimeric receptor derived from both adenovirus and bacteriophage can accommodate several different structures and be able to effectively direct the viral tropism, but not enough information to perform any initial *in silico* analysis of the protein structure and stagnating any attempts of proposing receptor optimizations.

In this study, we sought to model and test a 3D structure of the chimeric receptor utilized in the previously cited works with the added change of including a different targeting molecule at the C-terminus end to evaluate if the model can truly behave like in the previous cited articles (Figure 2). This endeavor seeks to make an initial *in silico* assessment of this proved and tested model to possibly postulate ways of optimizing the assembly of newer receptors and assist other research groups by making available data related to our model with the intention of both assisting the

planning and production process of their own receptors, and detecting possible complications in the computational model before progressing to *in vitro* testing.

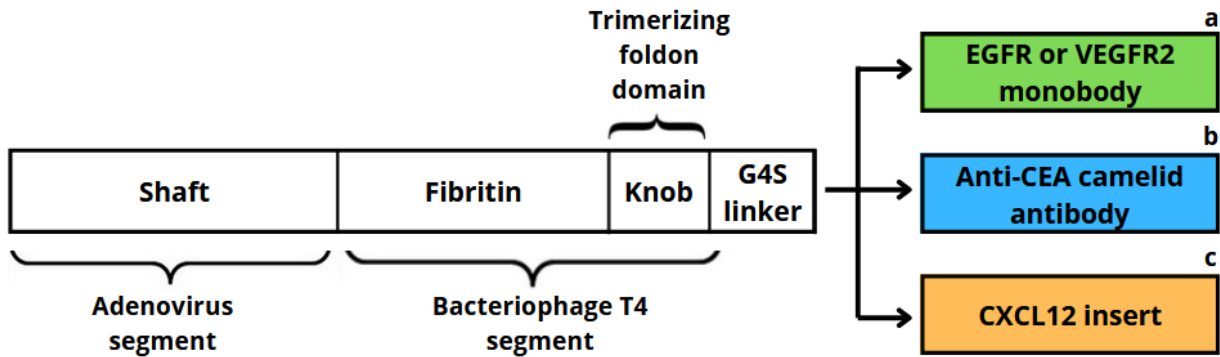


Figure 1. A representative model of the receptor derived from the fusion of the adenoviral shaft with the bacteriophage T4 fibrin and foldon domain. This chimeric receptor can accommodate several types of addition to its C-terminus segment. We have experimental data relating to the success of the following molecules that were added: (a) a monobody targeting EGFR or VEGFR2 (25); (b) an antibody derived from camelids to target the human glycoprotein Carcinoembryonic Antigen (CEA) (26); and (c) the ligand molecule CXCL12, used to target CXCR4 and CXCR7 (27).

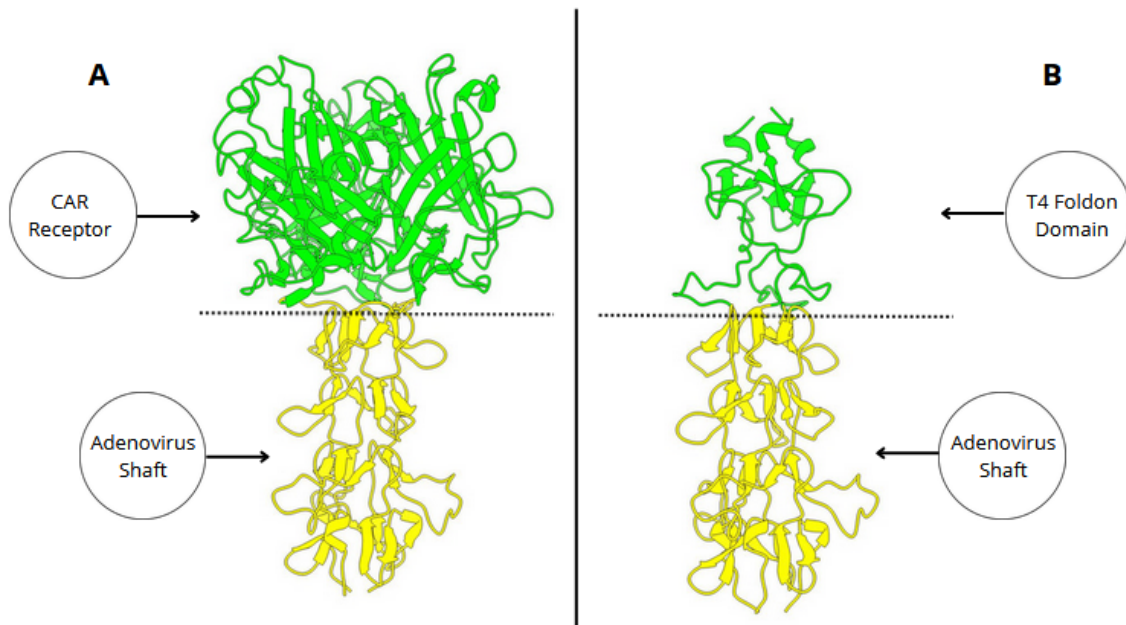


Figure 2. A comparison of the native structure of the adenovirus receptor (PDB code: 1QIU) (A) and the chimeric receptor derived from the fusion of the adenoviral shaft with the bacteriophage T4

foldon domain (**B**). The smaller chimeric structure is capable of maintaining its structural integrity after alterations like amino acid substitutions or fusions with other proteins, unlike the native adenovirus receptor.

Methodology

Initial recovery and model assembly

The 3D model of the chimeric receptor was made through the combined use of UCSF Chimera version 1.16 (28) and UCSF Chimera X (29,30) for visualization, and ColabFold to construct the predicted model based on our input sequence (31). The proteins that were used as the base for our models were recovered from the RCSB PDB database (32). We were able to recover a deposited structure of the adenovirus 2 shaft fused to the bacteriophage T4 fibritin and trimerization domain that presented a resolution of 1.90 Å (PDB code: 1V1I) (33); we opted to use the full sequence provided by the PDB structure instead of using the more popular adenoviral types 3 and 5 to avoid unforeseen variables. When we visualized the structure in UCSF Chimera 1.16, it was possible to detect gaps ranging from 7 to 11 amino acids where there was no correspondent residue when compared to the protein sequence. Protein gaps usually interfere or lead to errors during molecular dynamics, so we utilized the ColabFold function present in the UCSF Chimera X and inputted the trimeric sequence from 1V1I, added a glycine-serine linker (GGGGS) sequence (34) and finally the molecule responsible for the tropism function. The molecule used to confer the ability to bind to a certain target was a nanobody (9G8) capable of targeting EGFR, which was also collected from the PDB database (PDB code: 4KRP) (35). The choice of using the 9G8 nanobody present in this structure was made after considering the following: First, our current objective is the retrieval of data related to the receptor structure of a hypothetically functional oncolytic virus, so our choice should include a molecule that was already previously tested and capable of binding to a certain target; secondly, we selected an EGFR binder since it is a target already explored and a commonly super expressed molecule in several glioblastomas (36); and the third and final reason was that we opted to use a nanobody because it is capable of targeting a vast array of targets and can be adjusted to suit the researcher's

needs, so if we detected any deleterious alteration in the nanobody or the appearance of secondary structures that could potentially impair its function, the data generated in this study could potentially indicate what should be avoided in order to not incur in such issues. ColabFold was able to provide a satisfactory model that filled the gaps present in the 1V1I structure while also adding the linker and ligand molecule without any radical changes to the overall native form of each protein fused. The modeling of such a highly accurate model was due to the great capacity already presented in the original AlphaFold (37) and the ColabFold added function of using PDB templates for the modeling process; since we aimed to produce a greatly confident model, we based every segment of our model in an already existing PDB structure, which ended up improving the processing time of the model and providing us with a solid model for further testing. Finally, we verified the Z-score, a indicative value of the structure's quality, of our current model. We utilized the ProSA web server whose function allows us to check the overall model of the inputted protein and detect potential structural flaws based on their z-score. The z-score serves as an indication of the model quality based on experimental data from protein chains in the current PDB (38,39). Further verification of the models overall quality was made using Verify3D, a software that compares an 3D atomic model against its 1D self amino acid sequence by analyzing data related to the location and characteristics of the protein structures and comparing the output with other good structures (40,41). Finally, we used PROCHECK to analyze the geometry of both each residue individually and of the overall structure; we also included the results of the Ramachandran plot, to investigate if the residues of our models were located in energetically favored areas for backbone dihedral angles ψ against ϕ of the amino acids in the protein (42–44).

Molecular dynamics and protein analysis

To verify the structural stability in an aqueous solution of our models, we proceeded with a molecular dynamics (MD) simulation that was performed with the GROMACS software utilizing the version released in February of 2023 (45). The molecular dynamics of our models were made using the Amber ff99SB-ILDN

force field, the choice was made due to this version of Amber being an improved version of an already tested and efficient force field with further optimizations for amino acid side-chain torsion potentials (46). Since our model was very elongated, we opted to use dodecahedron-shaped boxes for the simulation to reduce the overall number of water molecules in the system and improve simulation time. The water model used for the solvation step was TIP3P, which was also the recommended choice from GROMACS (47). With the protein now inside the box filled with solvent, we then used the GENION method to add ions in order to neutralize the system. The energy minimization step was performed twice, starting with the steepest-descent method followed by a conjugate-gradient minimization. The next step included an NPT ensemble with a heating curve, where we gradually increased the system temperature by 50 K until we reached the desired temperature of 309 K. Finally, the production MD of every model we analyzed was performed for 200 nanoseconds (ns) using a time step of 0.002 picoseconds (ps). Analysis of RMSD, RMSF, gyrate radius and solvent accessible surface areas were all made using built-in functions inside GROMACS. The RMSD was measured to determine the average distance between the atoms of our proteins during the 200 ns simulation; this information would elucidate how much the protein moved during the simulation and if it would reach a stabilization point in the graphics. The presence of a plateau in the RMSD graphics would indicate that, after a certain amount of time, the structure would stabilize and serve as an indicator that the model did not denatured or suffered heavy structural alteration during the MD. To understand how much each segment of our chimeric structure diverged from the original position after the MD, we analyzed the root-mean-square fluctuation (RMSF) from our protein to properly identify mobile regions in the protein. Our focus was once again to observe if some key regions were hiding or assuming conformations capable of impairing their original function. The overall compactness of our system was measured through the gyrate radius (R_g), which represents the root mean square distance of a group of atoms from a selected center of mass. Finally, we performed a free energy landscape (FEL) analysis to observe the minimal energy conformations of our models utilizing the MD DaVis tool (48).

Secondary structure analysis and protein-protein docking

Analysis of secondary structures were made using the PDBsum web server (49) with the intention of verifying how the targeting molecule that we elected was going to behave throughout the simulation and if it had formed secondary structures capable of interfering with its binding affinity. We utilized LigPlot+ to properly identify the residues involved in the binding of the targeting molecule and the target protein (50); this information together with the simulation data and the secondary structure analysis could provide evidence that: in a proper, functional receptor, those regions should be available to properly interact with the desired molecule and should not stay “hidden” for longer periods of time during the simulation. To verify if the nanobody retained its capabilities of binding with EGFR after being attached to the chimeric receptor, we performed a protein-protein molecular docking utilizing HADDOCK 2.4 to visualize if the contact region of the receptor-bound nanobody remains in the same section as the original free nanobody depicted in the 4KRP crystal (51,52).

Discussion and concluding remarks

The purpose of this work was to understand and visualize how chimeric adenovirus receptors behaved during a molecular dynamics simulation. The subject of virotherapy is currently expanding with more treatments being tested and approved for human use, therefore, it is imperative that we fully grasp the details of how every part of these synthetic viruses works for both improving upon them and maintaining safety. Here, we tested *in silico* if it was possible to design and test a hypothetical viral receptor targeting EGFR to use in cancer therapy. The results we obtained demonstrated that the model we assembled appeared structurally viable and it is most likely functional for further testing. Based on these experiments and other *in vivo* testing by other groups, we can speculate that the chimeric adenovirus C and bacteriophage T4 scaffold can be used for a plethora of ligand molecules, especially nanobodies, in a reliable and consistent form. Through the use of bioinformatic tools, we manage to virtually assemble two proof

of concept structures for viral therapy that can be used to assist in the planning and assembly process of newer receptors for therapeutic purposes. Certain characteristics observed in this study beckons further testing, such as the fact that even at close proximity, the nanobody segment of our models never formed a stable interaction between each other; any occurrence of this event could severely reduce the ligand activity of the receptor. It is uncertain, however, if certain nanobodies can possess this hindering characteristic and it would be necessary to test sequences designed to have this unwanted attraction with its neighbors and verify if a stable entangling event occurs. Another factor that requires further testing is how the linker's length affects the overall functionality of the receptor. We observed in AdT4-S and its duplicate that the shorter linker caused the model to display a reduced flexibility and freedom of movement, but consequentially, more stable values of RMSD and RMSF when comparing itself with its duplicate. Another key aspect worth noting is how the CDR3 residues behave throughout the MD analysis, since the availability of those amino acids is crucial for the nanobody to bind in an appropriate fashion. We observed that the nanobody did not appear to assume conformations that might hide the CDR3 residues, which remained largely available for contact. From the analysis that we conducted, we can affirm with fairly high certainty that the four models will most likely remain in configurations that are stable and displaying the CDR3 region for contact; this assumption is backed up by the Free Energy Landscape (FEL) analysis that allowed us to recover minimal energy structures that illustrate the most stable conformations that the chimeric molecule can assume. The most notable detail observed when analyzing the FEL models was that they kept the CDR3 regions accessible, further corroborating to the quality of our assembled structures since the availability of the residues responsible for contacting the targeted molecule is critical for the overall effectiveness of an oncolytic virus. While the initial proof-of-concept tests of our chimeric protein show promise, it's essential to acknowledge the limitations of this work. We tested only two variations of a single construct, which despite the fact that each model was deeply examined, they still are insufficient to prove that the parameters used in our tests can be applied to properly assure the quality of a larger plethora of similar chimeric constructs. To address these limitations, further testing through meta-analysis becomes the essential next step to improve the robustness of our current work. The greatest

obstacle in performing large scale MD simulations is the computational cost required to run these tests, with each individual molecular dynamics in the proportions of our molecule requiring several days to conclude. In order to bypass these limitations, we would need to test and validate the use of a coarse grain model for our MD simulations. A coarse grain model, unlike the previously used atomistic simulations that account accurately for every atom in the system, coarse-grain simulations simplify this process by grouping multiple atoms into a single "bead" or particle. This simplification reduces the computational cost and enables longer timescales and larger molecule sizes to be used without a drastic increase in the processing time required to complete a simulation. In regards to the docking analysis, even though HADDOCK's data indicates that both models can bind with the EGFR molecule, we could not properly conclude if the differential linker size affected the binding process in some capacity. To answer this question, we would need to perform a MD simulation of both AdT4-L and AdT4-S in the same system as an EGFR molecule and investigate how each construct would interact with their target. It is worth noting that to increase the robustness of the simulation containing the two molecules, EGFR should be simulated together to a membrane, since the original molecule is a transmembrane protein. This test will reflect more closely the *in vivo* system, however, it would also lead to a tremendous increase in the computational cost to run such a system. Data from those future experiments will undoubtedly enrich the already concluded tests and will help in the development of a pipeline to develop and test candidates for viral receptors. The key elements addressed in this study that should be investigated and tested for future *in silico* research in viral receptors are: the state of the CDR regions and how available to the solvent they remain throughout the simulation and in the minimal energy models; the radius of gyration values to observe if sudden compaction models occurred that could lead to the receptor assuming closed conformations that could impact its functionality; the preservation of the nanobody's secondary structures after being fused to a chimeric construct; the preservation of the binding capabilities of the fused nanobody; and the overall stability of the model, accounting the percentage of amino acids present in favored regions and comparing with events of residues located in disallowed regions. Those aspects previously cited can be used to ascertain the quality of an *in silico* model designed by a research group; creating protocols and quality assurance

measures using data from studies such as this can increase the number of candidate receptors being created for possible therapeutic application or even assist in the design of new molecules using different components to achieve the same objective of being a highly specific receptor to direct the viral tropism towards targets of clinical interest.

References

1. Bommareddy PK, Patel A, Hossain S, Kaufman HL. Talimogene Laherparepvec (T-VEC) and Other Oncolytic Viruses for the Treatment of Melanoma. *Am J Clin Dermatol*. 2017 Feb;18(1):1–15.
2. Alberts P, Tilgase A, Rasa A, Bandere K, Venskus D. The advent of oncolytic virotherapy in oncology: The Rigvir® story. *Eur J Pharmacol*. 2018 Oct 15;837:117–26.
3. Kemp V, Lamfers MLM, van der Pluijm G, van den Hoogen BG, Hoeben RC. Developing oncolytic viruses for clinical use: A consortium approach. *Cytokine Growth Factor Rev*. 2020 Dec;56:133–40.
4. Tian Y, Xie D, Yang L. Engineering strategies to enhance oncolytic viruses in cancer immunotherapy. *Signal Transduct Target Ther*. 2022 Apr 6;7(1):117.
5. Kiyokawa J, Wakimoto H. Preclinical And Clinical Development Of Oncolytic Adenovirus For The Treatment Of Malignant Glioma. *Oncolytic Virotherapy*. 2019;8:27–37.
6. Gryciuk A, Rogalska M, Baran J, Kuryk L, Staniszewska M. Oncolytic Adenoviruses Armed with Co-Stimulatory Molecules for Cancer Treatment. *Cancers*. 2023 Mar 23;15(7):1947.
7. Maroun J, Muñoz-Alfá M, Ammayappan A, Schulze A, Peng KW, Russell S. Designing and building oncolytic viruses. *Future Virol*. 2017 Apr;12(4):193–213.
8. Sauthoff H, Pipiya T, Heitner S, Chen S, Bleck B, Reibman J, et al. Impact of E1a modifications on tumor-selective adenoviral replication and toxicity. *Mol Ther J Am Soc Gene Ther*. 2004 Oct;10(4):749–57.
9. Huang H, Liu Y, Liao W, Cao Y, Liu Q, Guo Y, et al. Oncolytic adenovirus programmed by synthetic gene circuit for cancer immunotherapy. *Nat Commun*. 2019 Oct 22;10(1):4801.
10. Krasnykh V, Belousova N, Korokhov N, Mikheeva G, Curiel DT. Genetic Targeting of an Adenovirus Vector via Replacement of the Fiber Protein with the Phage T4 Fibrin. *J Virol*. 2001 May;75(9):4176–83.
11. Kim JW, Kane JR, Young JS, Chang AL, Kanojia D, Morshed RA, et al. A Genetically Modified Adenoviral Vector with a Phage Display-Derived Peptide Incorporated into Fiber Fibrin Chimera Prolongs Survival in Experimental Glioma. *Hum Gene Ther*. 2015 Sep;26(9):635–46.
12. Stepanenko AA, Chekhonin VP. Tropism and transduction of oncolytic adenovirus 5 vectors in cancer therapy: Focus on fiber chimerism and mosaicism, hexon and pIX. *Virus Res*. 2018 Sep;257:40–51.
13. Ryu WS. Adenoviruses. In: *Molecular Virology of Human Pathogenic Viruses*. Elsevier; 2017 [cited 2023 Apr 25]. p. 111–24. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/B9780128008386000084>
14. Watanabe M, Nishikawaji Y, Kawakami H, Kosai K ichiro. Adenovirus Biology, Recombinant Adenovirus, and Adenovirus Usage in Gene Therapy. *Viruses*. 2021 Dec 14;13(12):2502.
15. Wold WSM, Toth K. Adenovirus vectors for gene therapy, vaccination and cancer gene therapy. *Curr Gene Ther*. 2013 Dec;13(6):421–33.

16. Matsunaga W, Gotoh A. Adenovirus as a Vector and Oncolytic Virus. *Curr Issues Mol Biol.* 2023 Jun 2;45(6):4826–40.
17. Alifieris C, Trafalis DT. Glioblastoma multiforme: Pathogenesis and treatment. *Pharmacol Ther.* 2015 Aug;152:63–82.
18. Tykocki T, Eltayeb M. Ten-year survival in glioblastoma. A systematic review. *J Clin Neurosci.* 2018 Aug;54:7–13.
19. van Tellingen O, Yetkin-Arik B, de Gooijer MC, Wesseling P, Wurdinger T, de Vries HE. Overcoming the blood-brain tumor barrier for effective glioblastoma treatment. *Drug Resist Updat Rev Comment Antimicrob Anticancer Chemother.* 2015 Mar;19:1–12.
20. Nussinov R, Tsai CJ, Jang H. Anticancer drug resistance: An update and perspective. *Drug Resist Updat Rev Comment Antimicrob Anticancer Chemother.* 2021 Dec;59:100796.
21. Kimball KJ, Preuss MA, Barnes MN, Wang M, Siegal GP, Wan W, et al. A Phase I Study of a Tropism-Modified Conditionally Replicative Adenovirus for Recurrent Malignant Gynecologic Diseases. *Clin Cancer Res.* 2010 Nov 1;16(21):5277–87.
22. Lang FF, Conrad C, Gomez-Manzano C, Yung WKA, Sawaya R, Weinberg JS, et al. Phase I Study of DNX-2401 (Delta-24-RGD) Oncolytic Adenovirus: Replication and Immunotherapeutic Effects in Recurrent Malignant Glioma. *J Clin Oncol Off J Am Soc Clin Oncol.* 2018 May 10;36(14):1419–27.
23. Li J, Meng Q, Zhou X, Zhao H, Wang K, Niu H, et al. Gospel of malignant Glioma: Oncolytic virus therapy. *Gene.* 2022 Apr;818:146217.
24. Lathwal A, Kumar R, Raghava GPS. Computer-aided designing of oncolytic viruses for overcoming translational challenges of cancer immunotherapy. *Drug Discov Today.* 2020 Jul;25(7):1198–205.
25. Matsui H, Sakurai F, Katayama K, Abe Y, Machitani M, Kurachi S, et al. A targeted adenovirus vector displaying a human fibronectin type III domain-based monobody in a fiber protein. *Biomaterials.* 2013 May;34(16):4191–201.
26. Kaliberov SA, Kaliberova LN, Buggio M, Tremblay JM, Shoemaker CB, Curiel DT. Adenoviral targeting using genetically incorporated camelid single variable domains. *Lab Investig J Tech Methods Pathol.* 2014 Aug;94(8):893–905.
27. O'Bryan SM, Mathis JM. CXCL12 Retargeting of an Oncolytic Adenovirus Vector to the Chemokine CXCR4 and CXCR7 Receptors in Breast Cancer. *J Cancer Ther.* 2021;12(06):311–36.
28. Pettersen EF, Goddard TD, Huang CC, Couch GS, Greenblatt DM, Meng EC, et al. UCSF Chimera--a visualization system for exploratory research and analysis. *J Comput Chem.* 2004 Oct;25(13):1605–12.
29. Goddard TD, Huang CC, Meng EC, Pettersen EF, Couch GS, Morris JH, et al. UCSF ChimeraX: Meeting modern challenges in visualization and analysis. *Protein Sci Publ Protein Soc.* 2018 Jan;27(1):14–25.
30. Pettersen EF, Goddard TD, Huang CC, Meng EC, Couch GS, Croll TI, et al. UCSF ChimeraX: Structure visualization for researchers, educators, and developers. *Protein Sci Publ Protein Soc.* 2021 Jan;30(1):70–82.
31. Mirdita M, Schütze K, Moriwaki Y, Heo L, Ovchinnikov S, Steinegger M. ColabFold: making protein folding accessible to all. *Nat Methods.* 2022 Jun;19(6):679–82.
32. Berman HM, Westbrook J, Feng Z, Gilliland G, Bhat TN, Weissig H, et al. The Protein Data Bank. *Nucleic Acids Res.* 2000 Jan 1;28(1):235–42.
33. Papanikolopoulou K, Teixeira S, Belrhali H, Forsyth VT, Mitraki A, Van Raaij MJ. Adenovirus Fibre Shaft Sequences Fold into the Native Triple Beta-Spiral Fold when N-terminally Fused to the Bacteriophage T4 Fibrin Foldon Trimerisation Motif. *J Mol Biol.* 2004 Sep;342(1):219–27.
34. Chen X, Zaro JL, Shen WC. Fusion protein linkers: property, design and functionality. *Adv Drug Deliv Rev.* 2013 Oct;65(10):1357–69.
35. Schmitz KR, Bagchi A, Roovers RC, van Bergen en Henegouwen PMP, Ferguson KM. Structural evaluation of EGFR inhibition mechanisms for nanobodies/VHH

- domains. *Struct Lond Engl* 1993. 2013 Jul 2;21(7):1214–24.
36. Li YM, Hall WA. Cell Surface Receptors in Malignant Glioma. *Neurosurgery*. 2011 Oct;69(4):980–94.
 37. Varadi M, Anyango S, Deshpande M, Nair S, Natassia C, Yordanova G, et al. AlphaFold Protein Structure Database: massively expanding the structural coverage of protein-sequence space with high-accuracy models. *Nucleic Acids Res*. 2022 Jan 7;50(D1):D439–44.
 38. Sippl MJ. Recognition of errors in three-dimensional structures of proteins. *Proteins Struct Funct Genet*. 1993 Dec;17(4):355–62.
 39. Wiederstein M, Sippl MJ. ProSA-web: interactive web service for the recognition of errors in three-dimensional structures of proteins. *Nucleic Acids Res*. 2007 May 8;35(Web Server):W407–10.
 40. Bowie JU, Lüthy R, Eisenberg D. A method to identify protein sequences that fold into a known three-dimensional structure. *Science*. 1991 Jul 12;253(5016):164–70.
 41. Lüthy R, Bowie JU, Eisenberg D. Assessment of protein models with three-dimensional profiles. *Nature*. 1992 Mar 5;356(6364):83–5.
 42. Richardson JS. The Anatomy and Taxonomy of Protein Structure. In: *Advances in Protein Chemistry*. Elsevier; 1981 [cited 2023 Jul 11]. p. 167–339. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0065323308605203>
 43. Laskowski RA, MacArthur MW, Moss DS, Thornton JM. PROCHECK: a program to check the stereochemical quality of protein structures. *J Appl Crystallogr*. 1993 Apr 1;26(2):283–91.
 44. Laskowski RA, Rullmannn JA, MacArthur MW, Kaptein R, Thornton JM. AQUA and PROCHECK-NMR: programs for checking the quality of protein structures solved by NMR. *J Biomol NMR*. 1996 Dec;8(4):477–86.
 45. Abraham MJ, Murtola T, Schulz R, Páll S, Smith JC, Hess B, et al. GROMACS: High performance molecular simulations through multi-level parallelism from laptops to supercomputers. *SoftwareX*. 2015 Sep;1–2:19–25.
 46. Lindorff-Larsen K, Piana S, Palmo K, Maragakis P, Klepeis JL, Dror RO, et al. Improved side-chain torsion potentials for the Amber ff99SB protein force field. *Proteins*. 2010 Jun;78(8):1950–8.
 47. Jorgensen WL, Chandrasekhar J, Madura JD, Impey RW, Klein ML. Comparison of simple potential functions for simulating liquid water. *J Chem Phys*. 1983 Jul 15;79(2):926–35.
 48. Maity D, Pal D. MD DaVis: interactive data visualization of protein molecular dynamics. *Bioinforma Oxf Engl*. 2022 Jun 13;38(12):3299–301.
 49. Laskowski RA, Jabłońska J, Pravda L, Vařeková RS, Thornton JM. PDBsum: Structural summaries of PDB entries. *Protein Sci Publ Protein Soc*. 2018 Jan;27(1):129–34.
 50. Laskowski RA, Swindells MB. LigPlot+: multiple ligand-protein interaction diagrams for drug discovery. *J Chem Inf Model*. 2011 Oct 24;51(10):2778–86.
 51. Van Zundert GCP, Rodrigues JPGLM, Trellet M, Schmitz C, Kastiris PL, Karaca E, et al. The HADDOCK2.2 Web Server: User-Friendly Integrative Modeling of Biomolecular Complexes. *J Mol Biol*. 2016 Feb;428(4):720–5.
 52. Honorato RV, Koukos PI, Jiménez-García B, Tsaregorodtsev A, Verlato M, Giachetti A, et al. Structural Biology in the Clouds: The WeNMR-EOSC Ecosystem. *Front Mol Biosci*. 2021 Jul 28;8:729513.
 53. Yadav BS, Tripathi V, Kumar A, Khan MdF, Barate A, Kumar A, et al. Molecular modeling and docking characterization of Dectin-1 (PAMP) receptor of *Bubalus bubalis*. *Exp Mol Pathol*. 2012 Feb;92(1):7–12.
 54. Hutchinson EG, Thornton JM. A revised set of potentials for beta-turn formation in proteins. *Protein Sci Publ Protein Soc*. 1994 Dec;3(12):2207–16.

5. Considerações finais

Nosso objetivo neste estudo foi elucidar e compreender como os receptores quiméricos de adenovírus se comportavam durante uma série de testes, incluindo análises de estrutura secundária, docking e simulações de dinâmica molecular. A pesquisa tem como visão um aumento das possibilidades terapêuticas atuais da viroterapia através de maneiras mais efetivas de prospectar e planejar a criação de um modelo adenoviral para tratar neoplasias. O advento de novos tratamentos virais surgindo e entrando em fase de testes e aprovação para aplicação em pacientes humanos torna de suma importância a compreensão adequada dos detalhes de funcionamento de cada componente desses vírus sintéticos, tanto para aprimorá-los quanto para garantir sua segurança. Neste estudo foi realizada uma prova de conceito *in silico* com o objetivo de avaliar se é possível projetar e testar um receptor viral hipotético utilizando somente dados depositados em bancos de dados públicos como o *Protein Data Bank*. Os resultados preliminares sugerem que o modelo que elaboramos apresenta viabilidade tanto do ponto de vista estrutural quanto funcional para esta prova de conceito inicial. As estruturas geradas AdT4-L e AdT4-S podem ser utilizadas como referência para construção de receptores quiméricos utilizando segmentos de outros adenovírus e/ou substituindo as regiões de CDR dos *nanobodies* fusionados; acreditamos que os testes conduzidos neste estudo oferecem uma primeira investigação estrutural confiável em cima deste constructo e é capaz de revelar características importantes como o nível de compactação da molécula, o grau de liberdade de movimento dos *nanobodies*, o nível de preservação de estruturas secundárias, e a preservação da capacidade de ligação do *nanobody* contra o seu antígeno específico. Os achados deste estudo reforçam o papel de modelos *in silico* para o desenvolvimento de novos receptores terapêuticos. Ao estabelecer protocolos e medidas de controle de qualidade com base em dados estruturais como os aqui apresentados, hipotetizamos que seja possível ampliar o leque de moléculas candidatas para servirem de receptores para viroterapia. Isso não apenas auxilia

a linha de pesquisa em vírus oncolítico como um todo, mas também facilita o design de moléculas altamente específicas, direcionadas a alvos de interesse clínico.

6. Perspectivas

Levando em consideração os resultados obtidos, os próximos passos envolveriam a realização de testes para avaliar características que ainda não foram totalmente elucidadas após a execução dos experimentos deste trabalho. Investigar como eventos de interações indesejadas entre nanobodies acontecem podem auxiliar no processo de design contra alvos específicos, provendo informações de quais alterações nas regiões de CDR devem ser evitadas a fim de evitar tal resultado. Associações de funcionalidade com o tamanho e quais aminoácidos foram utilizados na composição do segmento *linker* também devem ser investigados para determinar se existe, de fato, um tamanho e composição ideal para o modelo adenoviral. Apesar de altamente informativas, as simulações de dinâmica molecular que foram realizadas neste estudo requerem um custo computacional elevado e um longo tempo para finalizar apenas um modelo; esta limitação torna difícil a realização de meta-análises para aumentar o grau de confiabilidade dos nossos resultados. A execução em larga escala das análises de dinâmica molecular permitiria uma observação prolongada de constructos quiméricos e o comportamento de suas estruturas secundárias, uma simulação prolongada poderia revelar movimentos que não podem ser observados em uma janela de 200 nanosegundos e tais observações poderiam ser de valor inestimável para futuras investigações sobre a estrutura destes receptores. Outra maneira de diminuir o tempo necessário entre análises seria reduzir o tamanho do segmento adenoviral que serve como “haste” do receptor durante as simulações; porém tomar tal decisão requer uma investigação profunda das possíveis interferências nas interações de longo alcance e como o comportamento em simulação pode acabar refletindo tendências que não ocorreriam normalmente no sistema biológico. Identificar maneiras mais otimizadas de representar estas proteínas quiméricas também auxilia em testes de *docking* molecular; atualmente, avaliar ligação de ligante e receptor é delegado a ferramentas como o HADDOCK que foi utilizado neste trabalho, que apesar de fornecer uma informação confiável sobre a

interação de duas proteínas, acaba por não refletir adequadamente a natureza dinâmica da interação do receptor com o seu alvo e também não auxilia na investigação de como o constructo como um todo se comporta durante o processo de ligação. O trabalho com receptores de vírus oncolíticos representa a primeira etapa na criação de um modelo de vírus oncolítico que se compõe de um tropismo guiado por um receptor quimérico, um circuito genético fornecendo garantia que a replicação viral ocorra somente em células tumorais, e a inserção de um transgene para auxiliar na eliminação do câncer e/ou elicitar uma resposta imune efetiva no local.

7. Referências

- Ahmad E, Ali A, Nimisha , Kumar Sharma A, Ahmed F, Mehdi Dar G, Mohan Singh A, Apurva, Kumar A, Athar A et al. (2022) Molecular approaches in cancer. *Clin Chim Acta Int J Clin Chem* 537:60–73.
- Alberts P, Tilgase A, Rasa A, Bandere K and Venskus D (2018) The advent of oncolytic virotherapy in oncology: The Rigvir® story. *Eur J Pharmacol* 837:117–126.
- Barrueto L, Caminero F, Cash L, Makris C, Lamichhane P and Deshmukh RR (2020) Resistance to Checkpoint Inhibition in Cancer Immunotherapy. *Transl Oncol* 13:100738.
- Bommareddy PK, Patel A, Hossain S and Kaufman HL (2017) Talimogene Laherparepvec (T-VEC) and Other Oncolytic Viruses for the Treatment of Melanoma. *Am J Clin Dermatol* 18:1–15.
- Buchbinder EI and Desai A (2016) CTLA-4 and PD-1 Pathways: Similarities, Differences, and Implications of Their Inhibition. *Am J Clin Oncol* 39:98–106.
- Filley AC, Henriquez M and Dey M (2018) CART Immunotherapy: Development, Success, and Translation to Malignant Gliomas and Other Solid Tumors. *Front Oncol* 8:453.
- Gryciuk A, Rogalska M, Baran J, Kuryk L and Staniszewska M (2023) Oncolytic Adenoviruses Armed with Co-Stimulatory Molecules for Cancer Treatment. *Cancers* 15:1947.
- Hanahan D and Weinberg RA (2011) Hallmarks of Cancer: The Next Generation. *Cell* 144:646–674.
- Hou J, He Z, Liu T, Chen D, Wang B, Wen Q and Zheng X (2022) Evolution of Molecular Targeted Cancer Therapy: Mechanisms of Drug Resistance and Novel Opportunities Identified by CRISPR-Cas9 Screening. *Front Oncol* 12:755053.
- Huang H, Liu Y, Liao W, Cao Y, Liu Q, Guo Y, Lu Y and Xie Z (2019) Oncolytic adenovirus programmed by synthetic gene circuit for cancer immunotherapy. *Nat Commun* 10:4801.
- Kemp V, Lamfers MLM, van der Pluijm G, van den Hoogen BG and Hoeben RC (2020) Developing oncolytic viruses for clinical use: A consortium approach. *Cytokine Growth Factor Rev* 56:133–140.
- Kiyokawa J and Wakimoto H (2019) Preclinical And Clinical Development Of Oncolytic Adenovirus For The Treatment Of Malignant Glioma. *Oncolytic Virotherapy* 8:27–37.

- Krasnykh V, Belousova N, Korokhov N, Mikheeva G and Curiel DT (2001) Genetic Targeting of an Adenovirus Vector via Replacement of the Fiber Protein with the Phage T4 Fibrin. *J Virol* 75:4176–4183.
- Lathwal A, Kumar R and Raghava GPS (2020) Computer-aided designing of oncolytic viruses for overcoming translational challenges of cancer immunotherapy. *Drug Discov Today* 25:1198–1205.
- Maroun J, Muñoz-Alía M, Ammayappan A, Schulze A, Peng K-W and Russell S (2017) Designing and building oncolytic viruses. *Future Virol* 12:193–213.
- Nduom EK, Weller M and Heimberger AB (2015) Immunosuppressive mechanisms in glioblastoma. *Neuro-Oncol* 17 Suppl 7:vii9–vii14.
- Nussinov R, Tsai C-J and Jang H (2021) Anticancer drug resistance: An update and perspective. *Drug Resist Updat Rev Comment Antimicrob Anticancer Chemother* 59:100796.
- Sauthoff H, Pipiya T, Heitner S, Chen S, Bleck B, Reibman J, Chang W, Norman RG, Rom WN and Hay JG (2004) Impact of E1a modifications on tumor-selective adenoviral replication and toxicity. *Mol Ther J Am Soc Gene Ther* 10:749–757.
- Stepanenko AA and Chekhonin VP (2018) Tropism and transduction of oncolytic adenovirus 5 vectors in cancer therapy: Focus on fiber chimerism and mosaicism, hexon and pIX. *Virus Res* 257:40–51.
- Yu S, Liu Q, Han X, Qin S, Zhao W, Li A and Wu K (2017) Development and clinical application of anti-HER2 monoclonal and bispecific antibodies for cancer treatment. *Exp Hematol Oncol* 6:31.
- Zahid A, Siegler EL and Kenderian SS (2020) CART Cell Toxicities: New Insight into Mechanisms and Management. *Clin Hematol Int* 2:149–155.
- Zhang J, Huang D, Saw PE and Song E (2022) Turning cold tumors hot: from molecular mechanisms to clinical applications. *Trends Immunol* 43:523–545.