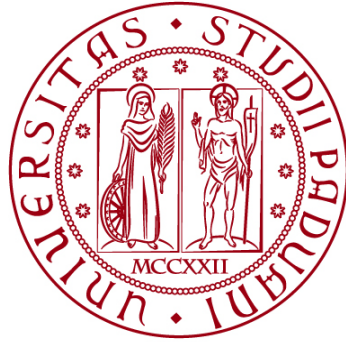


**UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI PADOVA**

**DIPARTIMENTO DI BIOLOGIA**

Corso di Laurea magistrale in Biologia Sanitaria



**TESI DI LAUREA**

**Caratterizzazione della replicazione di un HSV-1  
oncolitico in cellule di adenocarcinoma del  
pancreas e sviluppo di una strategia di  
somministrazione sistemica**

**Relatore:** Prof.ssa Arianna Calistri

Dipartimento di Medicina Molecolare

**Correlatore:** Dott. Alberto Reale

Dipartimento di Medicina Molecolare

**Laureanda:** Maria Carla Aidala

**ANNO ACCADEMICO 2022/2023**

# INDICE

<b>1. ABSTRACT</b> .....	1
<b>2. INTRODUZIONE</b> .....	3
<b>2.1 L'ADENOCARCINOMA DUTTALE DEL PANCREAS (PDAC)</b> .....	3
<b>2.1.1 LESIONI PRECANCEROSE E CARATTERIZZAZIONE GENETICA DELL' ADENOCARCINOMA PANCREATICO</b> .....	3
<b>2.1.2 TERAPIE ATTUALMENTE DISPONIBILI PER L'ADENOCARCINOMA DEL PANCREAS</b> .....	5
<b>2.2 I VIRUS ONCOLITICI</b> .....	8
<b>2.2.1 MECCANISMO D'AZIONE DEI VIRUS ONCOLITICI</b> .....	9
<b>2.2.2 LA VIROTERAPIA ONCOLITICA APPLICATA ALL'ADENOCARCINOMA DUTTALE DEL PANCREAS</b> .....	10
<b>2.3 HERPES SIMPLEX VIRUS DI TIPO 1</b> .....	12
<b>2.3.1 STRUTTURA DEL GENOMA E VIRIONE</b> .....	13
<b>2.3.2 CICLO LITICO DI HSV-1</b> .....	14
<b>2.4 HSV-1 COME VETTORE ONCOLITICO PER LA VIROTERAPIA ONCOLITICA</b> .....	15
<b>2.5 VIE DI SOMMINISTRAZIONE DEI VIRUS ONCOLITICI</b> .....	17
<b>2.6 LE CELLULE CARRIER PER LA SOMMINISTRAZIONE DEI VIRUS ONCOLITICI</b> .....	18
<b>2.6.1 Cellule staminali mesenchimali</b> .....	19
<b>2.6.2 Cellule del sistema immunitario: monociti e macrofagi</b> .....	20
<b>3. SCOPO DELLA TESI</b> .....	23
<b>4. MATERIALI E METODI</b> .....	25
<b>4.1 MATERIALI</b> .....	25
<b>4.1.1 CEPPPO VIRALE</b> .....	25
<b>4.1.2 LINEE CELLULARI</b> .....	25
<b>4.2 METODI</b> .....	26
<b>4.2.1 RICOSTITUZIONE DEL VIRUS <math>\alpha</math>HSV1-EGFP MEDIANTE TRASFEZIONE IN CELLULE HEK-293T ED AMPLIFICAZIONE DEL VIRUS IN CELLULE VERO</b> .....	26
<b>4.2.2 SAGGIO DI REPLICAZIONE VIRALE NELLE CELLULE DI ADENOCARCINOMA PANCREATICO HPAF E BxPC3</b> .....	26
<b>4.2.3 SAGGIO DI TITOLAZIONE VIRALE ATTRAVERSO CONTEGGIO DELLE PLACCHE</b> .....	27
<b>4.2.4 ISOLAMENTO E PURIFICAZIONE DEI MONOCITI CON EASYSEP™ MAGNET</b> .....	27

4.2.5 SAGGIO DI REPLICAZIONE VIRALE NEI MONOCITI PRIMARI COLTIVATI IN TERRENI CONDIZIONATI DALLE CELLULE HPAF .....	28
5. RISULTATI.....	29
5.1 RICOSTITUZIONE, AMPLIFICAZIONE E TITOLAZIONE DEL VIRUS oHSV1-EGFP.....	29
5.2 VALUTAZIONE DELLA CAPACITÀ DI REPLICAZIONE DEL VIRUS oHSV-1 EGFP NELLA LINEA CELLULARE TUMORALE BxPC3 .....	30
5.3 VALUTAZIONE DELLA CAPACITA' DI REPLICAZIONE DEL VIRUS oHSV-1 EGFP NELLA LINEA CELLULARE TUMORALE HPAF .....	35
5.4 ANALISI DEL POTENZIALE REPLICATIVO DI oHSV1-EGFP NEI MONOCITI COLTIVATI NEI TERRENI CONDIZIONATI DERIVATI DALLA CRESCITA DI CELLULE TUMORALI DI ADENOCARCINOMA PANCREATICO .....	37
6. DISCUSSIONE.....	39
7. CONCLUSIONI .....	45
8. BIBLIOGRAFIA.....	47

## 1. ABSTRACT

L'adenocarcinoma duttale del pancreas (PDAC) è un tumore particolarmente aggressivo che costituisce oltre il 90% di tutte le neoplasie pancreatiche. Accanto alle tradizionali opzioni terapeutiche attualmente disponibili ma che non si sono dimostrate sufficientemente efficaci per combattere questa forma di cancro, la viroterapia oncolitica costituisce una promettente strategia alternativa per il trattamento dell'adenocarcinoma pancreatico. La capacità posseduta dai virus oncolitici (OV) di uccidere selettivamente le cellule tumorali ed allo stesso tempo causare una stimolazione del sistema immunitario rappresenta un approccio innovativo per modulare il microambiente tumorale immunosoppressivo che caratterizza il PDAC.

In questo lavoro di tesi, è stato utilizzato il virus oncolitico oHSV-1 EGFP, basato sul virus dell'herpes simplex di tipo 1, al fine di valutare la sua capacità di infettare ed uccidere efficacemente due linee cellulari di adenocarcinoma pancreatico. Inoltre, con lo scopo di ottimizzare la via di somministrazione sistemica dei virus oncolitici, meno invasiva rispetto a quella intratumorale, è stata valutata la capacità dei monociti di fungere da cellule *carrier* per trasportare gli OV direttamente nel sito tumorale, proteggendoli dall'azione del sistema immunitario.



## **2. INTRODUZIONE**

### **2.1 L'ADENOCARCINOMA DUTTALE DEL PANCREAS (PDAC)**

L'adenocarcinoma duttale del pancreas è una neoplasia epiteliale estremamente invasiva che origina dalla trasformazione maligna delle cellule esocrine del pancreas, rappresentando oltre il 90% di tutti i tumori pancreatici (Tassone E. et al., 2020). Il suo tasso di mortalità è al quarto posto tra i tumori maligni ed il tasso di sopravvivenza a 5 anni è solo dell'8% (Wu and Cai, 2021). Ogni anno vengono diagnosticati circa 60.000 nuovi casi di PDAC, e circa il 50% dei pazienti ha una malattia avanzata alla diagnosi (Park W et al., 2021). A causa della sua prognosi sfavorevole, della bassa sopravvivenza e dell'impatto molto elevato sulla mortalità associata al tumore in Europa e negli Stati Uniti, si stima che il PDAC diventerà la seconda causa di morte correlata al cancro entro il 2030, preceduta solo dal carcinoma polmonare (Tassone E. et al., 2020).

I fattori di rischio associati all'insorgenza del tumore al pancreas sono stati ampiamente studiati nel corso degli ultimi anni (Parrasia S. et al., 2021). Fattori di rischio genetici o non modificabili sono associati al nesso di causalità nel 5-10% dei nuovi casi di adenocarcinoma pancreatico (Hezel A.F. et al., 2006). L'età è considerata il fattore determinante più critico, in quanto la maggior parte dei pazienti che ricevono tale diagnosi hanno un'età superiore ai 50 anni, con una particolare incidenza tra i 70 ed 80 anni. Anche fattori di rischio legati allo stile di vita, o fattori di rischio modificabili, che includono il fumo, l'obesità, l'abuso di alcol ed il diabete, sono stati collegati all'insorgenza del PDAC (Parrasia S. et al., 2021).

Gli attuali trattamenti standard di cura, tra cui chirurgia, chemioterapia e radioterapia, risultano essere non completamente efficaci a causa della resistenza ad esse dimostrata dell'adenocarcinoma pancreatico (Anderson E.M. et al., 2021). L'immunoterapia rappresenta un'altra importante opzione terapeutica contro il cancro del pancreas, ma trova scarsa applicazione a causa del microambiente tumorale particolarmente immunosoppressivo (Wu and Cai, 2021).

Nonostante i progressi nella comprensione della biologia di base dell'adenocarcinoma pancreatico, i tassi di sopravvivenza sono rimasti sostanzialmente invariati negli ultimi 30 anni. Pertanto, vi è un'assoluta necessità di sviluppare nuove strategie terapeutiche (Pelosi E. et al., 2017).

#### **2.1.1 LESIONI PRECANCEROSE E CARATTERIZZAZIONE GENETICA DELL'ADENOCARCINOMA PANCREATICO**

L'adenocarcinoma duttale pancreatico insorge comunemente nella testa del pancreas con infiltrazione nei tessuti circostanti, inclusi vasi linfatici, milza, cavità peritoneale, e con metastasi al fegato e ai polmoni (Hezel A.F. et al., 2006). La progressione del tessuto pancreatico da normale a tumorale consiste in una ben definita sequenza di eventi istopatologici e biologici, in cui la carcinogenesi è il risultato di un graduale accumulo di multiple e consecutive alterazioni molecolari,

quali l'attivazione di oncogeni, l'inibizione di geni soppressori e le mutazioni geniche (Barcellini A. et al., 2020).

Studi clinici ed istopatologici hanno identificato tre lesioni precancerose del PDAC: lesioni neoplastiche intraepiteliali (PanIN), cistoadenomi mucinosi (MCN) e lesioni papillari mucinose intraduttali (IPMN). Di queste lesioni precursori, la più comune ed ampiamente studiata è PanIN, che si trova nei dotti pancreatici di calibro più piccolo. Quest'ultima viene classificata dagli stadi I a III, con il primo stadio caratterizzato dall'aspetto di un epitelio colonnare mucinoso, con crescente disorganizzazione architetturale ed atipia nucleare attraverso gli stadi II e III. MCN e IPMN sono invece lesioni precancerose meno comuni (Hezel A.F. et al., 2006). Recenti analisi genomiche hanno rivelato che l'adenocarcinoma duttale pancreatico ospita geni frequentemente mutati, tra cui KRAS, TP53, CDKN2A e SMAD4, che possono alterare ampiamente i processi e i comportamenti cellulari (Sun H. et al., 2020).

La mutazione di KRAS è un evento precoce nella cancerogenesi e riportato fino al 95% dei casi di PDAC (Barcellini A. et al., 2020). Questo gene svolge ruoli molteplici ed essenziali nella regolazione di crescita cellulare, proliferazione, differenziazione, apoptosi e di altri processi biologici. La sua principale mutazione è la sostituzione dell'amminoacido alla dodicesima posizione della proteina KRAS, cioè la glicina è sostituita dall'acido aspartico. Normalmente, la proteina KRAS passa dalla forma inattiva legata al GDP a quella attiva legata al GTP, permettendo al ciclo di crescita cellulare di mantenersi in uno stato equilibrato. Tuttavia la mutazione genetica KRAS modifica la configurazione della proteina KRAS, causando la perdita della sua attività GTPasica. Inoltre, il suo stato di attivazione continua porterà a trasduzione del segnale aberrante, proliferazione cellulare incontrollata e apoptosi inibita. Di conseguenza, può portare all'insorgenza del processo tumorale (Sun H. et al., 2020).

Il gene TP53 codifica la proteina p53, che è responsabile del mantenimento della stabilità genetica e cellulare. Quest'ultima regola il ciclo cellulare all'interfaccia G1/S e svolge un ruolo cruciale nel provocare la morte cellulare programmata in reazione al danno al DNA. L'inattivazione di TP53 consente alla cellula con danno al DNA di eludere importanti punti di controllo per innescare l'apoptosi. È mutato (principalmente da mutazioni puntiformi) nel 75-85% dei casi di PDAC (Sun H. et al., 2020).

Il gene CDKN2A (p16-INK4a, MTS-1 o CDK4I) è un soppressore tumorale che inibisce la progressione nel ciclo cellulare inattivando i complessi ciclina D-CDK4 e ciclina D-CDK6 che regolano il punto di controllo della fase G1/S. La sua inattivazione si verifica nel 98% dei casi di PDAC ed è causata da un diverso tipo di mutazione (perdita di eterozigosi, delezione omozigote o silenziamento del promotore). La sua alterazione è un evento precoce nella patogenesi ed è infatti descritta anche nelle lesioni PanIN-2 preneoplastiche (Barcellini A. et al., 2020).

Infine, lo SMAD4 è un messaggero intracellulare del TGF- $\beta$  e mostra un effetto antitumorale inibendo la crescita cellulare. Le mutazioni SMAD4 si possono trovare in circa la metà dei tumori pancreatici. In caso di una sua inattivazione dovuta a mutazioni somatiche, le cellule PDAC possono perdere la loro sensibilità all'inibizione della crescita del TGF- $\beta$ . Inoltre, si può verificare la soppressione

della risposta immunitaria antitumorale, aumentando l'invasione e la metastasi delle cellule tumorali e inducendo l'angiogenesi (Sun H. et al., 2020). Le lesioni pancreatiche precancerose e gli eventi genetici coinvolti nella progressione dell'adenocarcinoma duttale del pancreas sono riportati in figura 1.

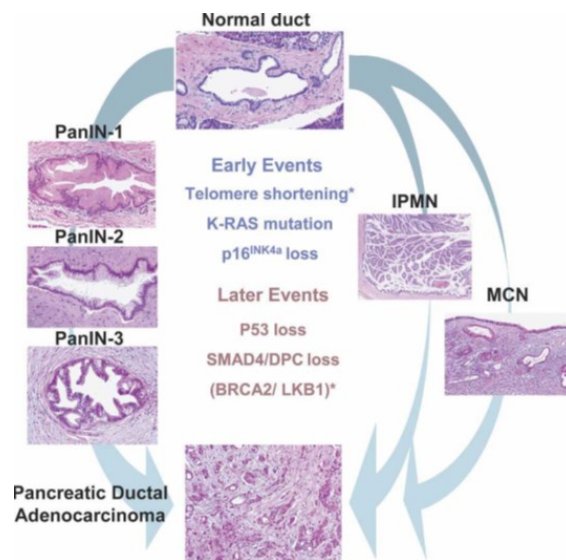


Figura 1. Nell'immagine sono raffigurate le tre lesioni precancerose del PDAC umano note: PanIN, MCN e IPMN. Lo schema della classificazione di PanIN è mostrato a sinistra; l'aumento del grado (1-3) riflette l'aumento dell'atipia, che alla fine porta all' adenocarcinoma pancreatico. Nella parte di destra viene illustrata la potenziale progressione di MCN e IPMN a PDAC. I vari eventi genetici sono elencati e divisi in quelli che si verificano prevalentemente all'inizio o alla fine della progressione del PDAC. Gli asterischi indicano eventi che non sono noti per essere comuni a tutti i precursori (l'accorciamento dei telomeri e la mutazione del gene *BRCA2* sono documentati in PanIN, mentre la mutazione del gene *LKB1* è documentata in un sottoinsieme di PDAC e IPMN). Tratto da Hezel A.F. et al., 2006.

### 2.1.2 TERAPIE ATTUALMENTE DISPONIBILI PER L'ADENOCARCINOMA DEL PANCREAS

L'adenocarcinoma duttale del pancreas viene definito generalmente come un "cancro silente" in quanto, nella maggior parte dei casi, i sintomi e segni si manifestano quando la malattia è già progredita verso uno stadio avanzato (Barcellini A. et al., 2020). Nonostante siano stati raggiunti significativi miglioramenti nello sviluppo e nella ricerca di nuove terapie sistemiche per il trattamento del tumore al pancreas, la resezione chirurgica rimane una componente essenziale del trattamento di cura (Anderson E. M. et al, 2021). Sfortunatamente, nel momento in cui viene diagnosticato, meno del 20% dei pazienti presenta un tumore resecabile. Una volta metastatizzato, la prognosi del cancro al pancreas è infausta. Il trattamento chemioterapico rimane l'opzione principale per i pazienti con tumori avanzati e metastatici. Le radiazioni, in combinazione con la chemioterapia, sono un'altra opzione per il cancro metastatico non resecabile. Tuttavia, gli effetti raggiunti da entrambi gli approcci sono principalmente un lieve



aumento del tasso di sopravvivenza e una riduzione dei sintomi correlati al cancro (Anderson E. M. et al., 2021).

Il primo farmaco utilizzato per il trattamento del PDAC è stato il 5-Fluorouracile (5-FU). Nel 1997 è stato sostituito dalla Gemcitabina, che è diventata la pietra angolare della chemioterapia nel trattamento del cancro al pancreas, con un aumento del beneficio in termini di sopravvivenza di 1,25 mesi (Parrasia S. et al., 2021). Recentemente, sulla base della comprovata attività vantaggiosa e sinergica dei suoi particolari componenti, una combinazione multifarmaco (Irinotecan, Oxaliplatino, Fluorouracile e Leucovorin) denominata Folfirinox si è dimostrata un'efficace terapia di prima linea, in particolare per i pazienti con carcinoma pancreatico metastatico. L'effetto antitumorale nei pazienti con cancro avanzato è stato dimostrato in uno studio di fase I e confermato in uno studio di fase II-III, che ha esplorato la risposta dei pazienti al Folfirinox e alla Gemcitabina a singolo agente. La superiorità di Folfirinox rispetto alla Gemcitabina è stata riconosciuta in tutti i parametri di efficacia, inclusi sopravvivenza complessiva (OS) (11,1 vs. 6,8 mesi), sopravvivenza libera da progressione (PFS) (6,4 vs. 3,3 mesi) e tasso di sopravvivenza a un anno (48,4% vs. 20,6 %), che ha presentato un miglioramento statisticamente significativo (Adamska A. et al., 2017).

Negli ultimi anni, l'immunoterapia ha dimostrato d'essere un altro importante metodo antitumorale oltre alla chirurgia e alla chemioterapia. L'immunoterapia è un metodo terapeutico per combattere i tumori attivando il sistema immunitario umano: può uccidere le cellule tumorali e controllare lo sviluppo dei tumori stimolando e potenziando la risposta immunitaria dei pazienti (Wu and Cai, 2021). Come mostrato in figura 2, l'immunoterapia per il cancro al pancreas comprende principalmente inibitori del *checkpoint* immunitario, vaccini, terapie cellulari adottive, e virus oncolitici, che verranno approfonditi in maniera più specifica nei paragrafi 2.2 e 2.2.1.

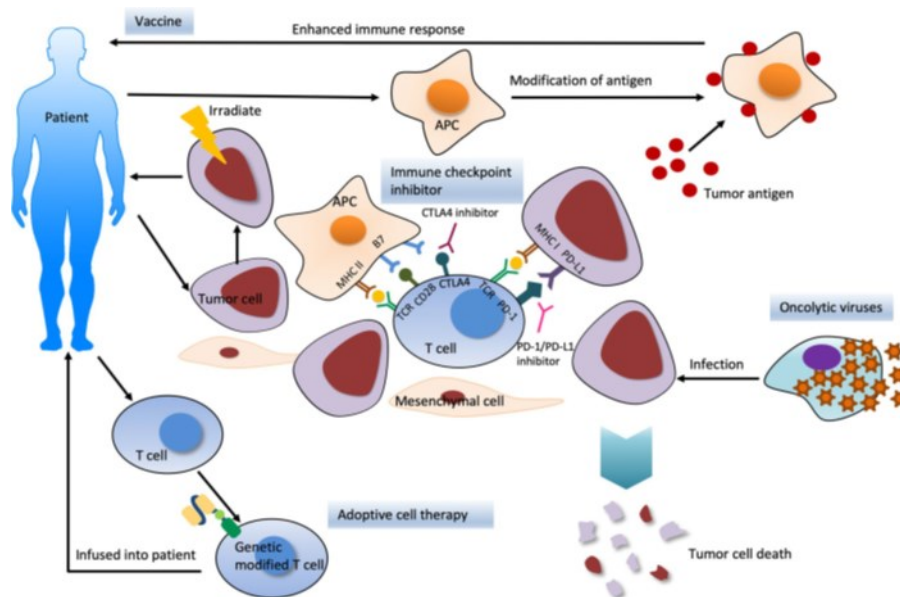


Figura 2. I metodi di immunoterapia includono inibitori del *checkpoint* immunitario, vaccini, terapie cellulari adottive, virus oncolitici. Tratto da Wu and Cai, 2021.

La prima opzione, gli inibitori del *checkpoint* immunitario, potenziando l'attività stimolatoria o bloccando l'attività dei regolatori del sistema immunitario, intensifica le risposte anticancro esistenti, consentendo una migliore eliminazione delle cellule tumorali (Adamska A. et al., 2017).

Dall'approvazione da parte della FDA (*Food and Drug Administration*) del primo inibitore del *checkpoint* immunitario, Ipilimumab, l'uso di inibitori del *checkpoint* si è rivelato tra le scoperte più promettenti nel moderno trattamento del cancro. L'Ipilimumab, inizialmente approvato per il trattamento del melanoma in stadio III/IV, raggiunge un'azione terapeutica bloccando l'antigene CTLA-4 dal legame con i suoi ligandi B7.1 e B7.2 che aveva lo scopo di inibire l'IL-2 e la differenziazione dei linfociti T. Sebbene il blocco CTLA-4 abbia avuto successo nel melanoma, se usato come singolo agente nel PDAC di stadio III/IV, non ha mostrato efficacia. Con l'avanzare della ricerca in immunoterapia, vari altri punti di controllo immunitari si sono rivelati di significativa importanza clinica, tra cui in particolare il recettore PD-1 e il suo ligando PD-L1. Nel 2014, gli anticorpi bloccanti PD-1/PD-L1 Pembrolizumab e Nivolumab sono stati approvati per il trattamento del melanoma in stadio III/IV dopo aver mostrato efficacia. Da allora, gli agenti bloccanti PD-1/PD-L1 hanno mostrato una significativa attività antitumorale in più tipi di tumore, tra cui il carcinoma polmonare non a piccole cellule e i tumori gastrointestinali con carenze di riparazione del *mismatch*. Tuttavia, anche in questo caso il PDAC ha mostrato resistenza agli approcci terapeutici che inibiscono le vie PD-1/PD-L1. Questa mancanza di risposta clinica può essere dovuta alla composizione delle cellule all'interno del microambiente tumorale (TME). I tumori con una forte risposta all'inibizione dei *checkpoint* tendono ad avere un TME con numerosi linfociti T, mentre il TME del PDAC è prevalentemente occupato da cellule immunosoppressive ed è quasi privo di cellule antitumorali pro-infiammatorie (Anderson E. M. et al., 2021).

Un altro metodo per aumentare l'attività immunitaria antitumorale a livello del microambiente tumorale prevede l'utilizzo di vaccini terapeutici (Anderson E. M. et al., 2021). In breve, ci sono tre principali piattaforme vaccinali per PDAC: vaccini basati su cellule dendritiche (DC), vaccini basati su cellule tumorali e vaccini basati su batteri. Un'altra piattaforma vaccinale per PDAC è quella a cellule tumorali intere che utilizza cellule tumorali autologhe e/o allogeniche con o senza *editing* genetico. Trattasi di un sistema di vaccini a cellule intere ampiamente utilizzato per il trattamento di vari tipi di cancro, incluso il PDAC. I vaccini GVAX per l'adenocarcinoma pancreatico derivano da due linee cellulari di cancro al pancreas ingegnerizzate con il gene GM-CSF; questi vaccini possono essere iniettati per via intradermica e secernono alti livelli di GM-CSF per attrarre cellule presentanti l'antigene (APC) e promuoverne la maturazione. È stato dimostrato che i vaccini sono sicuri, tuttavia hanno dimostrato effetti modesti (Fan J.Q. et al., 2020). La terapia di trasferimento delle cellule T è emersa come un altro strumento nel potenziamento della risposta immunitaria (Adamska A. et al., 2017). Generalmente, le terapie cellulari adottive utilizzano cellule effettrici immunitarie autologhe o allogeniche, come i linfociti T o le cellule *natural killer* (NK), per sradicare il tumore. Dopo il prelievo, dal tumore del paziente o dal sangue, vengono selezionate le cellule effettrici immunitarie e la loro funzionalità può essere migliorata *in vitro*, per esempio attraverso modificazioni genetiche per esprimere i recettori chimerici dell'antigene CAR che riconoscono uno specifico antigene presente sulla superficie delle cellule tumorali, oppure per esprimere il recettore dei linfociti T (TCR) che individua in modo specifico i peptidi associati al complesso maggiore di istocompatibilità (MHC). Queste cellule così ingegnerizzate vengono quindi somministrate al paziente. Questa terapia è ancora in una fase iniziale di sviluppo e richiede l'ottimizzazione per ottenere una persistenza a lungo termine dopo il trasferimento ed un'infiltrazione sufficiente nelle masse tumorali (Timmer F.E.F. et al., 2021).

## 2.2 I VIRUS ONCOLITICI

I virus oncolitici (OV) sono definiti come virus geneticamente modificati o presenti in natura che si replicano selettivamente e uccidono le cellule tumorali senza danneggiare i tessuti sani (Fukuhara H. et al., 2016). Una delle caratteristiche peculiari degli OV è che l'infezione nelle cellule tumorali porta al rilascio di nuovi virioni maturi che possono infettare le cellule circostanti, portando ad una propagazione dell'effetto terapeutico. Sebbene alcuni virus mostrino un tropismo innato per i tumori, altri virus devono essere ingegnerizzati molecularmente per infettare selettivamente le cellule tumorali. Ad esempio, il capsido può essere alterato per migliorare il legame del virus ai recettori di ingresso cellulare che si trovano esclusivamente, o sovraespressi, sulle cellule tumorali. I virus oncolitici possono, inoltre, replicarsi preferenzialmente nelle cellule tumorali perché le risposte antivirali in queste cellule sono disfunzionali (Bommareddy P.K. et al., 2018). In varie forme di cancro la via di segnalazione dell'interferone viene interrotta, il che si traduce in una diminuzione dell'attività della proteina chinasi PKR; PKR è una proteina chinasi intracellulare che riconosce l'RNA a doppio

filamento e altri elementi virali che portano alla morte cellulare e all'eliminazione del virus. In alcune cellule cancerose, la cascata di segnalazione PKR viene interrotta, ciò consente alla replicazione virale di procedere senza interruzioni. Nel tessuto sano, tuttavia, la produzione di interferon e fattori correlati all'interferone limita la replicazione virale e aumenta il tasso di *clearance* virale (Bommareddy P.K. et al., 2018).

Gli OV possono essere basati su DNA (per esempio adenovirus, virus dell'herpes simplex e poxvirus) o basati su RNA (per esempio virus della stomatite vescicolare e reovirus). Essi hanno una diversa stabilità del genoma, apparato e strategia di espressione e meccanismo di replicazione. Di conseguenza hanno diversa efficacia citotossica e differente potenzialità per innescare una risposta immunitaria. Risulta quindi fondamentale comprendere appieno sia la biologia virale che quella tumorale per selezionare un candidato appropriato per l'oncolisi virale. I virus a DNA sono stati storicamente selezionati come *backbone* per la terapia OV poiché hanno un genoma più stabile e più grande che li rende più adatti per l'ingegneria genetica e l'aggiunta di più transgeni (Moaven O. et al., 2021).

La loro capacità di entrare e distruggere le cellule tumorali è stata proposta per la prima volta più di un secolo fa, ma i loro benefici terapeutici nei malati di cancro sono stati dimostrati solo di recente negli studi clinici, con l'aiuto del miglioramento della tecnologia biologica e genetica che ne ha generati di più potenti e tumore-specifici. Vi è stato un maggiore interesse per gli OV grazie a una migliore comprensione dei meccanismi della biologia virale, dell'immunologia dei tumori e della genetica molecolare. Di conseguenza, negli ultimi due decenni c'è stato un vasto sviluppo nelle terapie OV che ha portato alla loro maggiore specificità, potenza e tollerabilità, nonché a più terapie che combinano l'utilizzo dei virus oncolitici con altre forme di immunoterapia antitumorale (Shi T. et al., 2020).

### **2.2.1 MECCANISMO D'AZIONE DEI VIRUS ONCOLITICI**

I virus oncolitici inducono l'immunità antitumorale mediante molteplici meccanismi: i) la lisi delle cellule tumorali mediata dal virus porta al rilascio di antigeni e neoantigeni associati al tumore (TAA e TAN) che possono essere catturati ed elaborati dalle cellule presentanti l'antigene che si infiltrano nel tumore (in particolare le cellule dendritiche), portando ad una risposta dei linfociti T contro un ampio spettro di antigeni rilasciati; ii) gli OV possono promuovere diverse forme di morte cellulare immunogenica (ICD) tra cui necrosi, necroptosi, piroptosi, morte cellulare autofagica e apoptosi immunogenica, portando al rilascio di *pattern* molecolari associati al pericolo (DAMP) come la calreticulina esposta in superficie (ecto-CRT) e l'adenosina trifosfato (ATP). Oltre al rilascio di DAMP, la lisi delle cellule tumorali mediata dai virus oncolitici è solitamente associata al rilascio di vari *pattern* molecolari associati ai patogeni (PAMP) inclusi componenti virali come gli acidi nucleici (DNA, dsRNA, ssRNA), proteine e componenti del capsido. I DAMP e i PAMP sono riconosciuti dai recettori presenti sulle cellule del sistema immunitario innato come le cellule dendritiche e le cellule *natural killer* e funzionano come segnali di "pericolo" e "*eat me*". Questa segnalazione attira più cellule dendritiche verso il microambiente tumorale (TME) che a sua volta porta ad

un aumento del reclutamento e della maturazione dei linfociti T tumore-specifici nel TME ; iii) alcuni OV come HSV-1 ed il virus del vaccino possono infettare e replicarsi nelle cellule endoteliali causando la rottura dei vasi tumorali, facilitando potenzialmente la migrazione delle cellule immunitarie nel TME; iv) l'infezione delle cellule tumorali da parte di un OV porta a una risposta infiammatoria e alla produzione localizzata di citochine, seguita dall'infiltrazione di cellule immunitarie innate e linfociti T citotossici che aiutano a ripolarizzare il microambiente tumorale verso un fenotipo meno immunosoppressivo (Ylösmäki and Cerullo, 2020). Una rappresentazione schematica del meccanismo d'azione dei virus oncolitici è riportato in figura 3.

Uno degli ulteriori vantaggi dei virus oncolitici, come accennato precedentemente, è che il loro genoma può essere geneticamente modificato, consentendo l'incorporazione di transgeni immunomodulatori ("virus oncolitici armati"), anch'essi rilasciati dalle cellule tumorali infette. Tale armamento immunologico può mirare a diminuire la soppressione immunitaria nel TME e/o aumentare l'attivazione immunitaria (Timmer F.E.F. et al., 2021).

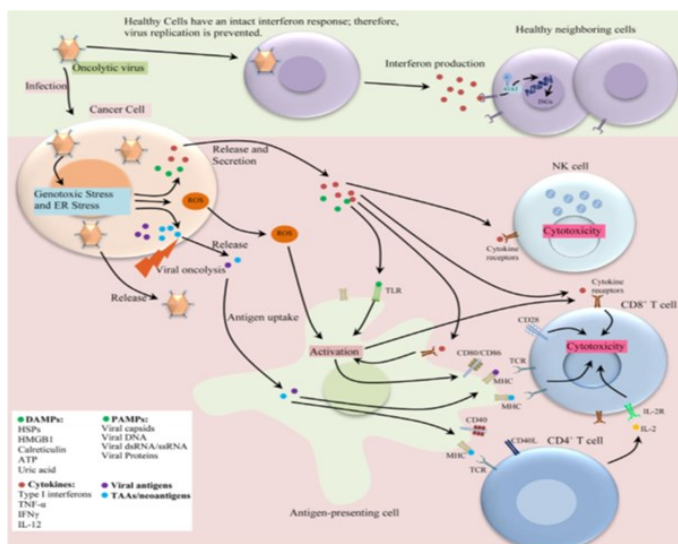


Figura 3. La stimolazione della immunità antitumorale locale e sistemica indotta dai virus oncolitici. Tratto da Goradel N.H. et al., 2021.

## 2.2.2 LA VIROTERAPIA ONCOLITICA APPLICATA ALL'ADENOCARCINOMA DUTTALE DEL PANCREAS

La viroterapia oncolitica rappresenta una strategia alternativa promettente, ma non completamente esplorata, per il trattamento del PDAC. Molteplici sfide hanno ostacolato l'efficacia della viroterapia oncolitica per il PDAC, la più significativa delle quali è il microambiente tumorale particolarmente immunosoppressivo (TME). Il TME del PDAC è caratterizzato da un abbondante stroma che circonda le cellule tumorali pancreatiche e frequentemente occupa la maggior parte della massa tumorale. Lo stroma è un'entità molto varia e dinamica contenente fibroblasti associati al cancro, cellule stellate pancreatiche, cellule immunitarie (come macrofagi associati al tumore e linfociti T regolatori), matrice extracellulare (ECM)

e fattori immunosoppressivi solubili, e la sua composizione è alterata durante lo sviluppo e la progressione del tumore. L'ECM denso e rigido composto da collagene, fibronectina, proteoglicani, acido ialuronico ed enzimi di rimodellamento dell'ECM altera la normale architettura del tessuto pancreatico e dei vasi sanguigni e linfatici; queste notevoli modifiche determinano un aumento della pressione del fluido interstiziale e la generazione di un TME ipovascolare e ipossico che limita la quantità di agenti antitumorali che raggiungono il tumore. Poiché gli OV possiedono proprietà sia oncolitiche che immunostimolanti, offrono un'opportunità senza precedenti di modulare e contrastare il TME immunosoppressivo ed evocare una risposta infiammatoria, stimolando il reclutamento di cellule immunitarie come le cellule presentanti l'antigene, i linfociti T CD8 e cellule *natural-killer* (NK) al sito del tumore e di migliorare l'efficacia terapeutica contro la malattia. Sfruttare questa capacità di interferire e interrompere il TME immunosoppressivo del PDAC rappresenta un approccio completamente nuovo per la terapia contro il cancro che può portare alla generazione di risposte immunitarie antitumorali forti e durature (Tassone E. et al., 2020). I principali *trial* clinici per il trattamento del tumore al pancreas sono riportati nella seguente tabella.

Fase di studio	Tipologia di virus	Nome del virus	Via di somministrazione	Modificazioni genetiche	Stato/Risultati
I/II	Adenovirus	ONYX-015	IT	Delezione di E1B	10 pazienti su 21 hanno avuto una risposta parziale
I/IIa	Adenovirus	LOAd703	IT	TMZ-CD40L,4-1BBL	In corso
I	Adenovirus	VCN-01	IT	Ialuronidasi umana PH20	Completato
I	Herpesvirus	HF-10	IT	Mancanza dell'espressione del gene UL56	In corso
I	Herpesvirus	T-Vec	IT	GM-CSF	Completato
Ib	Reovirus	Pelareorep (Reolysin)	IV	-	Completato
II	Reovirus	Pelareorep (Reolysin)	IV	-	Nessun miglioramento nella PFS se comparato con la chemioterapia
Ib	Virus del vaccino	GL-ONC1 (GLV-1h68)	IV	RUC-GFP	Attivo

IT: via intratumorale, IV: via endovenosa; GM-CSF: Granulocyte-macrophage-stimulating factor, PFS: sopravvivenza libera da progressione, TMZ: trimerized membrane-bound isoleucine zipper.

Tabella 1. I principali virus oncolitici in *trial* per il trattamento del tumore al pancreas. Modificato da LaRocca C.J. et al., 2018.

### 2.3 HERPES SIMPLEX VIRUS DI TIPO 1

Il virus dell'herpes simplex di tipo 1, appartenente alla famiglia *Herpesviridae*, alla sottofamiglia *Alphaherpesvirinae*, ed al genere *Simplexvirus*, è stato il primo herpes virus umano ad essere stato scoperto (Jin F. et al., 2016). I tassi mondiali di sieroprevalenza di HSV-1 vanno dal 50 al 90% e la maggior parte della popolazione acquisisce l'infezione nei primi anni di vita e durante l'adolescenza (Elbadawy H. M. et al., 2012).

Le infezioni primarie sono acquisite prevalentemente tramite il contatto diretto con lesioni o fluidi del corpo infetti (saliva, fluidi genitali, essudati di lesioni attive (Arduino P.G. et al., 2008).

In seguito all'infezione primaria, il virus si replica in modo produttivo all'interno delle cellule epiteliali della mucosa ed entra nei neuroni sensoriali attraverso le terminazioni nervose. Il virus viene quindi trasportato nei corpi cellulari neuronali dove può verificarsi la latenza. Durante il periodo di infezione latente, non vi è da parte delle cellule infettate produzione di virus infettivi, nell'ospite non vi sono sintomi di malattia e non si verifica la trasmissione della malattia stessa. (Nicoll M.P. et al., 2012).

Tuttavia, a intervalli sporadici durante la vita dell'ospite, spesso associati allo stress, l'HSV-1 latente può subire la riattivazione, un processo in cui il virus riavvia la replicazione produttiva e produce virioni che vengono rilasciati dai terminali neuronali per diffondere nuovamente l'infezione nell'epitelio, di solito in corrispondenza o in prossimità del sito di infezione primario. Virioni privi di cellule emessi dall'epitelio durante la riattivazione sono gli agenti responsabili della trasmissione uomo-uomo (Rice S. A., 2021). È importante notare che l'infezione da HSV-1 è spesso asintomatica. Quando si manifestano i sintomi, vi è un'ampia gamma di manifestazioni cliniche tra cui herpes orolabiale, sicosi erpetica (follicolite da HSV), *herpes gladiatorum*, infezione oculare da HSV (herpes oculare), encefalite erpetica, *eczema herpeticum*. La prognosi dell'infezione da HSV-1 varia a seconda della gravità della manifestazione e della sua localizzazione. L'encefalite erpetica è un'infezione grave, tipicamente fatale, infatti la mortalità è superiore al 70% se non trattata; colpisce principalmente il lobo temporale del cervello portando a comportamenti bizzarri e *deficit* neurologici focali localizzati al lobo temporale. I pazienti possono avere anche febbre e stato mentale alterato. La prognosi dell'herpes oculare può anch'essa essere grave se il paziente sviluppa la rottura del globo oculare o la cicatrizzazione corneale, poiché questi processi possono portare alla cecità. Nei pazienti immunocompromessi, l'infezione da HSV può causare infezioni gravi e croniche, la manifestazione più comune è costituita da ulcerazioni in rapida espansione o lesioni verrucose/pustolose. Non è raro che i pazienti abbiano un coinvolgimento del tratto respiratorio o gastrointestinale e presentino dispnea o disfagia (Saleh D. et al., 2022).

Sebbene esistano antivirali efficaci contro HSV-1, come l'Acyclovir, è necessario sviluppare ulteriori approcci terapeutici. Questo perché gli attuali farmaci anti-HSV non sono in grado di eradicare definitivamente le infezioni e non impediscono che si verifichino mutazioni virali. Inoltre, per il momento non esistono vaccini autorizzati (Rice S. A., 2021).

### 2.3.1 STRUTTURA DEL GENOMA E VIRIONE

I virioni di HSV-1 sono particelle quasi sferiche di ~ 200 nm di diametro, costituite da quattro strati distinti. Lo strato più esterno è l'*envelope*, un doppio strato lipidico derivante dalla cellula ospite e contiene 17 proteine codificate dal virus, 12 delle quali sono glicoproteine (Rice S. A., 2021). Queste glicoproteine funzionano come proteine di attacco, fusione, strutturali ed anti-immuni. Cinque di queste glicoproteine (gB, gC, gD e il complesso di gH e gL) mediano l'ingresso di HSV-1 nelle cellule ospiti (Elbadawy H. M. et al., 2012).

Sotto l'*envelope* si trova il tegumento, uno strato proteico complesso composto da più di 20 polipeptidi virali ed anche da alcune proteine dell'ospite. Le proteine del tegumento sono cruciali per l'assemblaggio del virione e molte svolgono anche importanti funzioni replicative. Ad esempio, alcune di esse utilizzano le proteine motorie microtubulari della cellula per consentire ai nucleocapsidi di transitare attraverso il citoplasma. Altre proteine del tegumento vengono rilasciate nel citoplasma all'inizio dell'infezione e regolano l'espressione genica dell'ospite e del virus. Sotto il tegumento si trova il capsido, un guscio icosaedrico composto da otto proteine virali (Rice S. A., 2021). La proteina virale 5 (VP5) è la principale proteina del capsido, che si associa in pentameri od esameri per formare la maggior parte del guscio del capsido (Liashkovich I. et al., 2011). All'interno di quest'ultimo è presente il quarto e più interno strato, il genoma virale a doppio filamento lineare da 152 kb, che codifica ~ 85 proteine virali. (Rice S. A., 2021).

Strutturalmente, il genoma è diviso in segmenti distinti, comprendenti due principali frammenti unici (unico lungo o UL e unico corto o US), ciascuno dei quali è delimitato da lunghe ripetizioni invertite (RL e RS, con prefissi I o T che indicano la parte interna o terminale ed il pedice che indica con quale regione unica confinano), a loro volta delimitati da segmenti ripetuti più brevi, noti come "a". La sequenza "a" viene ripetuta in una o più copie alla giunzione IRL/IRS ed è presente anche nelle estremità terminali di TRL e TRS, consentendo di invertire l'orientamento dei segmenti unici l'uno rispetto all'altro, producendo così quattro isomeri genomici in rapporti uguali e con uguale funzionalità (Denes C. E. et al., 2020). In figura 4 è possibile osservare una rappresentazione schematica del virione e del genoma di HSV-1.



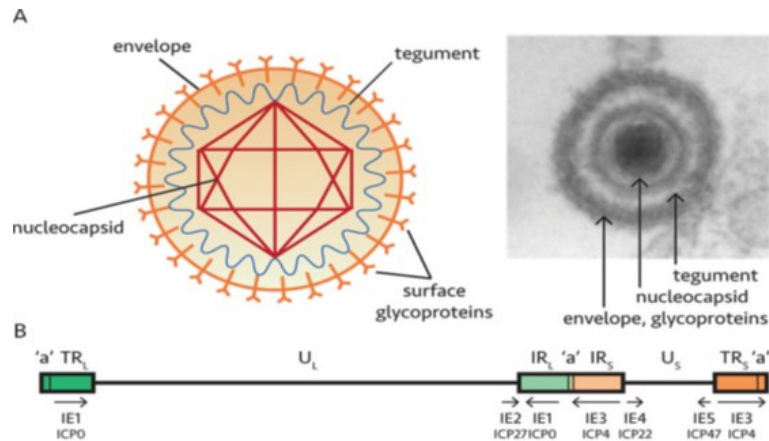


Figura 4. Rappresentazione del virione e del genoma di HSV-1.  
 Tratto da Denes C. E. et al., 2020

### 2.3.2 CICLO LITICO DI HSV-1

L'ingresso di HSV-1 nelle cellule è un complesso processo che richiede il coinvolgimento sia di recettori cellulari sia di glicoproteine virali dell'*envelope*. L'interazione iniziale tra proteoglicani cellulari (come eparan solfato) e gC è seguita da interazioni tra recettori cellulari e gD. I recettori per HSV-1 che sono stati identificati includono l'*herpes virus entry mediator* (HVEM) e la nectina-1. Successivamente, il legame di gD al suo recettore cellulare recluta il complesso di fusione gB/gH/gL per innescare la fusione tra la membrana virale e quella cellulare (Denes C.E. et al., 2020).

La fusione dell'involucro virale con la membrana cellulare consente l'ingresso del capsid nel citoplasma e il rilascio delle proteine del tegumento. Il DNA virale viene quindi trasportato al nucleo cellulare all'interno del nucleocapsid ora nudo. Il nucleocapsid si attacca quindi alla membrana nucleare della cellula ospite consentendone l'inserimento del genoma virale (Scanlan H. et al., 2022). Il genoma virale lineare quindi circolarizza prima che si verifichi la produzione delle proteine virali (Nicoll M.P. et al., 2012).

L'RNA messaggero dell'herpesvirus porta all'espressione di una varietà di proteine che svolgono un'ampia gamma di funzioni, che vanno dall'assemblaggio del virione alla soppressione delle risposte antivirali della cellula ospite. L'espressione genica si verifica in tre fasi della trascrizione e questi geni sono stati designati come  $\alpha$ ,  $\beta$  e  $\gamma$ , che corrispondono rispettivamente alle fasi immediate precoci, precoci e tardive dell'espressione genica. Le proteine espresse durante la fase  $\alpha$  influenzano l'espressione genica cellulare e virale, compresa l'espressione genica  $\beta$ . Durante la fase  $\beta$  della trascrizione, vengono espresse le proteine coinvolte nella replicazione del DNA, inclusa la DNA polimerasi virale. La maggior parte dei geni  $\gamma$  codifica per proteine strutturali. In seguito alla trascrizione nel nucleo, i trascritti virali lasciano il nucleo per essere tradotti nel citoplasma o nel contesto del reticolo endoplasmatico (RE). I capsidi, invece, sono assemblati nel nucleo, racchiudendo il genoma virale in un rivestimento proteico icosaedrico. Il capsid virale appena generato acquisisce un *envelope* a partire nella membrana nucleare interna. Il virus

completato trasloca attraverso l'ER (reticolo endoplasmatico) e matura nell'apparato di Golgi, prima di uscire dalla cellula per esocitosi (Scanlan H. et al., 2022). In figura 5 è possibile osservare una rappresentazione schematica del ciclo litico di HSV-1.

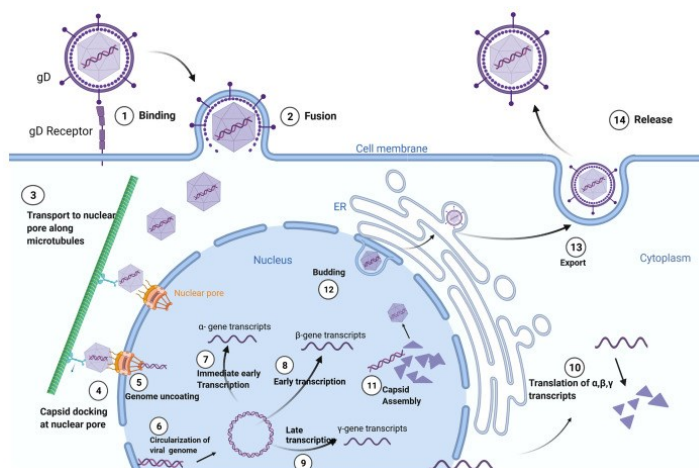


Figura 5. Ciclo litico del virus HSV-1. Tratto da Scanlan H. et al., 2022.

## 2.4 HSV-1 COME VETTORE ONCOLITICO PER LA VIROTERAPIA ONCOLITICA

HSV-1 ha molte caratteristiche che lo rendono un candidato ideale per il suo impiego nella viroterapia oncolitica. Innanzitutto, è un virus a DNA contenente un grande genoma che non si integra in quello dell'ospite. Il genoma del virus contiene diversi elementi ridondanti e geni non necessari per l'infezione, che insieme alle sue dimensioni, permette di ingegnerizzare il genoma virale per l'inserimento di cassette geniche terapeutiche di grandi dimensioni o multiple, utilizzando tecniche di clonazione molecolare standard che consentono di aumentare la specificità del tumore e migliorarne la sicurezza. Inoltre, la sua replicazione può essere controllata con farmaci specifici per l'herpesvirus come l'Acyclovir (Scanlan H. et al., 2022). Il riconoscimento dell'herpes simplex virus geneticamente modificato Talimogene Laherparepvec (T-VEC) da parte della *Food and Drug Administration* (FDA) e dalla Commissione Europea per la viroterapia oncolitica costituisce il maggior passo in avanti nell'applicazione dei virus per il trattamento del cancro (Mondal M. et., 2020). Anche se finora T-VEC è l'unico virus approvato dalla FDA come virus oncolitico, una serie di virus che derivano da HSV-1 è oggetto di studi clinici e pre-clinici. Quest'ultimi presentano differenti strategie di attenuazione e di somministrazione oltre a possedere differenti transgeni, molti dei quali si suppone che vadano ad alterare il microambiente tumorale. Per quanto riguarda il T-VEC, si tratta, come precedentemente accennato, di un virus basato su HSV-1 con delezioni nei geni  $\gamma$  34.5 e  $\alpha$ 47 e il gene GM-CSF (*granulocyte-macrophage colony stimulating factor*) inserito nei loci  $\gamma$  34.5 eliminati (Fukuhara H. et al., 2016).

La delezione del gene ICP34.5, che codifica per il fattore di neurovirulenza, impedisce la replicazione del virus nei neuroni senza influenzarne la replicazione in altre cellule, in particolare le cellule tumorali. ICP34.5 è essenziale, infatti, per bloccare il pathway della proteina chinasi attivata da RNA (PKR). Molte cellule tumorali sono deficienti del *pathway* PKR, rendendo le delezioni di ICP34.5 più selettive per le cellule tumorali (Mondal M. et., 2020).

T-VEC è stato, inoltre, come rappresentato in figura 6, ulteriormente progettato per migliorare la presentazione antigenica e l'attivazione dei linfociti T eliminando il gene che codifica la proteina ICP47, che normalmente riduce la distruzione immunitaria delle cellule infette da HSV-1 codificando per l'inibitore del trasportatore associato alla presenza dell'antigene in modo da prevenire il legame dell'antigene al complesso maggiore di istocompatibilità di classe I (MHC-I). Questa delezione migliora quindi l'espressione dell'MHC-I sulla superficie cellulare, la presentazione antigenica e la sicurezza, compromettendo la capacità del virus di eludere il riconoscimento immunitario nelle cellule ospiti. Inoltre, l'inattivazione di ICP47 in T-VEC pone *Herpes unique short 11 (Us11)* sotto il controllo del promotore immediato precoce, il che si traduce in un'espressione potenziata e precoce di Us11, il cui prodotto genico inibisce l'attività di PKR (Conry R.M. et al., 2018).

Per migliorare ulteriormente l'immunogenicità T-VEC, sono state inserite due copie del gene GM-CSF (*granulocyte-macrophage colony stimulating factor*) nel sito genomico ICP 34.5 cancellato. Si tratta di una citochina immunomodulatoria che promuove l'accumulo di cellule dendritiche nei siti di infiammazione e potenzia la risposta immunitaria contro le cellule tumorali (Goradel N.H. et al., 2021).

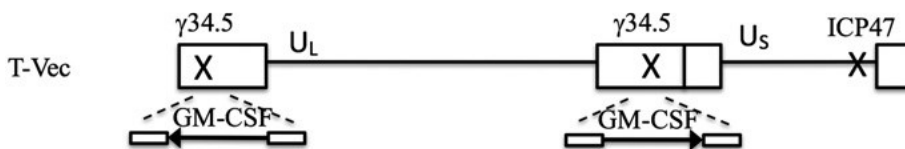


Figura 6. Rappresentazione schematica di T- Vec. Tratto da Fukuhara H. et al., 2016.

Per quanto concerne l'applicazione del vettore oncolitico HSV-1 all'adenocarcinoma duttale del pancreas, un primo studio clinico di fase I che valuta la sicurezza dell'iniezione intratumorale di T-VEC in pazienti con PDAC avanzato ha dimostrato la sua fattibilità e tollerabilità; è attualmente in corso un secondo studio con T-VEC con l'obiettivo di determinare le dosi ottimali del virus e la sua efficacia sul contenimento del tumore in ulteriori pazienti PDAC non resecabili. Due studi clinici di fase I hanno anche analizzato la sicurezza e l'efficacia dell'iniezione intratumorale dell'herpesvirus oncolitico a mutazione spontanea denominato HF10, in combinazione con la chemioterapia, in pazienti con PDAC non resecabili. Nello studio completato il trattamento con HF10 non ha causato tossicità e ha generato una risposta parziale alla terapia o una malattia stabile nella

maggior parte dei casi (rispettivamente tre e quattro su nove) con due pazienti che hanno raggiunto una sopravvivenza a lungo termine di tre anni; l'infiltrazione dei linfociti T CD4+ e CD8+ è stata osservata anche in prossimità di cellule tumorali residue. Uno studio in corso sta ora testando l'HF10 con la chemioterapia in una coorte di pazienti più ampia. Un terzo herpesvirus oncolitico, OrienX010, è stato esaminato in uno studio clinico di fase I per il trattamento del PDAC e di altri tumori solidi. Come T-VEC, OrienX010 è stato progettato per esprimere il gene GM-CSF umano che migliora le funzioni immunitarie antitumorali quando espresso ad alti livelli nel sito del tumore. La sperimentazione con OrienX010 è stata completata, ma i risultati dello studio non sono stati ancora resi noti. Sebbene l'efficacia di OrienX010 nei pazienti con PDAC debba ancora essere definita, si sono ottenuti risultati incoraggianti da studi preclinici ancora in corso che hanno dimostrato la capacità di OrienX010 di inibire la crescita tumorale in un modello murino di adenocarcinoma duttale pancreatico (Tassone E. et al., 2020).

## **2.5 VIE DI SOMMINISTRAZIONE DEI VIRUS ONCOLITICI**

La somministrazione terapeutica dei virus oncolitici dipende dal tipo di virus e dal tipo di tumore. La via di somministrazione intratumorale è attualmente la più utilizzata perché aggira molti degli ostacoli associati agli OV come piattaforma terapeutica. Infatti, facilita la consegna diretta di particelle virali infettive nel tumore iniettato, bypassando così la diluizione sistemica nel volume sanguigno, l'immunità antivettoriale e il sequestro in siti fuori bersaglio, con un minor rischio di replicazione in cellule non bersaglio. Sebbene l'oncolisi possa verificarsi solo nei tumori iniettati, una risposta antitumorale può essere generata anche nelle lesioni non iniettate quando viene indotta una risposta immunitaria sistemica sufficiente (Harrington K. et al., 2019).

La posizione anatomica del tumore, tuttavia, può imporre sfide tecniche per la somministrazione locale. Nonostante i siti non iniettati potrebbero beneficiare della risposta immunitaria sistemica, la risposta al trattamento non è efficace e spesso metastasi distanti mancano del beneficio desiderato (Moaven O. et al., 2021).

La somministrazione endovenosa, invece, ha una maggiore possibilità di raggiungere metastasi disseminate così come il tumore primario (Roy and Bell, 2013). Nonostante la necessità di una somministrazione sistemica efficiente dei virus oncolitici, essa presenta diversi ostacoli, che sono riassunti in figura 7. Il sistema immunitario ha sviluppato infatti diversi meccanismi per prevenire la diffusione sistemica di microrganismi e non discrimina tra agenti patogeni e virus oncolitici terapeutici. La somministrazione endovenosa espone i virus oncolitici a fattori circolanti come gli anticorpi, che si legano e neutralizzano direttamente i virus o li contrassegnano per la distruzione da parte del complemento e di varie cellule immunitarie. I virus sono anche neutralizzati dal legame non specifico alle proteine del siero e alle cellule circolanti presenti nel flusso sanguigno. Anche organi come il polmone, la milza e in particolare il fegato svolgono un ruolo significativo nell'eliminazione del virus dal flusso sanguigno perché questi tessuti contengono macrofagi residenti, il cui ruolo è quello di ripulire il sangue da patogeni circolanti. Poiché questi meccanismi sono presenti negli individui non

ancora venuti a contatto con virus perché sono parte del sistema immunitario innato, la neutralizzazione dei virus oncolitici è ancora maggiore se si è verificata una precedente esposizione al virus. Dato che l'immunità adattativa è in grado di produrre una risposta immunitaria significativamente più specifica e potente rispetto a quella innata, ciò rappresenta un ulteriore e significativo ostacolo a un efficace regime di dosaggio ripetuto utilizzando virus oncolitici. In realtà, una parte significativa della popolazione umana è già stata esposta e quindi ha sviluppato una memoria immunologica a molti dei virus oncolitici attualmente in fase di sviluppo e sperimentazione clinica, tra cui reovirus, virus del vaccino, e virus del morbillo. Oltre alla neutralizzazione del virus nel flusso sanguigno, barriere fisiche come la matrice extracellulare del tumore, nonché la limitata diffusione dei virus oncolitici nel tessuto tumorale a causa dell'elevata pressione del fluido interstiziale all'interno di esso, possono comportare una minore somministrazione di virioni all'interno delle cellule tumorali (Roy and Bell, 2013).

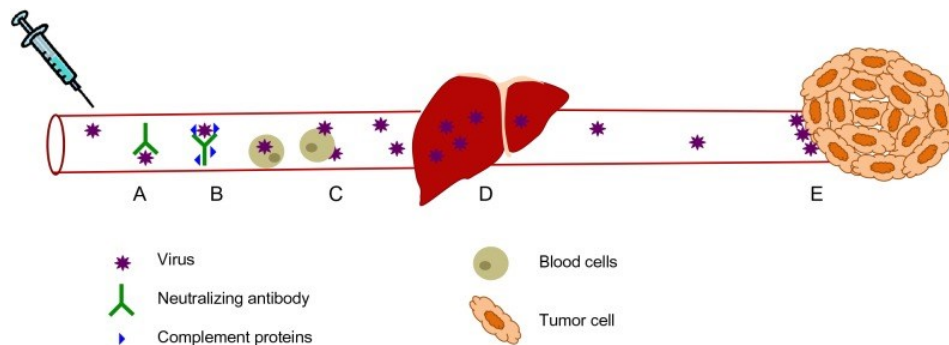


Figura 7. Neutralizzazione dei virus durante la via di somministrazione sistemica. Tratto da Roy and Bell, 2013.

## 2.6 LE CELLULE CARRIER PER LA SOMMINISTRAZIONE DEI VIRUS ONCOLITICI

Per superare alcune delle sfide presentate nella somministrazione sistemica di virus oncolitici, diversi ricercatori stanno esplorando l'uso delle cellule come veicoli di consegna per i virus oncolitici (Roy and Bell, 2013).

In teoria, la cellula *carrier* dovrebbe proteggere il virus dalla neutralizzazione e dirigerlo specificamente verso il sito tumorale, limitando così la tossicità ai tessuti normali, ma dovrebbe anche avere una propria attività antitumorale. Caratteristiche aggiuntive, quali un profilo di sicurezza favorevole, facilità di isolamento e/o produzione, sono caratteristiche importanti da considerare quando si deve decidere quale tipo di cellula *carrier* sia il più adatto per l'applicazione clinica (Roy and Bell, 2013). Il ventaglio di cellule *carrier* testate fino ad oggi comprende popolazioni di leucociti misti, come le cellule mononucleari del midollo osseo (BM) e del sangue periferico (PBMC), cellule staminali mesenchimali (MSC), cellule staminali neurali (NSC) e cellule immunitarie selezionate quali cellule dendritiche, monociti, macrofagi e linfociti T circolanti o geneticamente modificate. Queste cellule sono utilizzate come cavalli di Troia, nascondendo gli OV dal riconoscimento e

dall'attacco da parte del sistema immunitario, il che consente una finestra terapeutica più ampia, e hanno dimostrato la capacità di entrare nei tessuti tumorali e rilasciarvi il loro carico virale (Lemos de Matos A. al., 2020). Questo lavoro di tesi si concentra nella trattazione delle cellule staminali mesenchimali e delle cellule del sistema immunitario, quali monociti e macrofagi.

### **2.6.1 Cellule staminali mesenchimali**

Le MSC sono cellule stromali multipotenti che possono differenziarsi in una varietà di tipi di cellule, inclusi adipociti, condrociti e osteoblasti. Sono facilmente ottenibili da vari tessuti tra cui il midollo osseo, il tessuto adiposo, il cordone ombelicale e il sangue periferico e proliferano abbastanza rapidamente in coltura, rendendo possibile l'espansione a numeri sufficientemente grandi per l'applicazione clinica (Roy and Bell, 2013).

Numerosi studi hanno rivelato che le MSC hanno proprietà antinfiammatorie ed immunosoppressive, quindi queste cellule generano e rilasciano un numero di citochine solubili, come IL-6, IL-10, TGF- $\beta$ 1, ed eme ossigenasi-1 (HO-1). Queste citochine sono essenziali nell'immunosoppressione e nell'inibizione della maturazione dei linfociti B e nella limitazione della loro capacità di produrre immunoglobuline, inibendo la secrezione di citochine da parte dei linfociti T *helper*, riducendo le azioni citotossiche dei linfociti T effettori, diminuendo la proliferazione, citotossicità e generazione di citochine da parte delle cellule *natural killer*. Inoltre, in uno studio sulla nefropatia diabetica nei ratti, è stato dimostrato che le MSC sopprimono le cellule dendritiche CD103+ e i macrofagi CD68+ CD11c+ nei reni e alleviano il danno renale. Sono anche in grado di inibire la differenziazione dei monociti CD14+ e delle cellule progenitrici CD34+ in cellule dendritiche mature, limitare la differenziazione e la funzione delle cellule dendritiche, e quindi aumentare lo sviluppo dei linfociti T regolatori e la generazione di altri linfociti, compresi i linfociti B che producono IL-10 e le cellule dendritiche che producono IL-10. Queste azioni sono caratteristiche essenziali per inibire l'infiammazione locale durante la viroterapia e consentire al virus oncolitico di replicarsi e distruggere le cellule tumorali senza il vincolo immunitario (Ghasemi Darestani N. et al., 2023).

Infine, di particolare interesse per il trattamento del cancro sistemico è il fatto che le MSC migrino verso siti di lesione e infiammazione, che sono due caratteristiche del TME. Le MSC rispondono ai mediatori dell'infiammazione che sono altamente espressi nel tumore come il fattore di crescita dell'endotelio vascolare (VEGF), fattore di crescita dei fibroblasti (FGF), fattore stimolante le colonie di granulociti-macrofagi, fattore di crescita ematopoietico, fattore di crescita degli epatociti (HGF), fattore di crescita epidermico (EGF), fattore di crescita TGF- $\beta$ 1, chemochine (CCL2, CCL3 e CXCL-12), citochine (IL-6 e IL-8), integrine (come la molecole di adesione delle cellule vascolari 1) e selectine (P-selectina ed E-selectina). In risposta a questi mediatori locali dell'infiammazione tumorale, le MSC avviano un processo di rotolamento simile a quello descritto per i leucociti in risposta anche all'infiammazione, per cui aderiscono all'epitelio vascolare e iniziano la tras migrazione nel tumore. L'evidenza della migrazione tumorale delle MSC è

stata riportata per diversi tipi di cancro, il che evidenzia il loro potenziale come cellule *carrier* per la viroterapia oncolitica. Il loro facile isolamento ed espansione, oltre alle loro proprietà di eludere il sistema immunitario e di migrare verso il tumore, rendono le MSC particolarmente adatte ad essere valutate come cellule *carrier* per gli OV (Moreno R., 2021).

### **2.6.2 Cellule del sistema immunitario: monociti e macrofagi**

Il microambiente tumorale (TME) dell'adenocarcinoma duttale del pancreas (PDAC) è fondamentalmente immunosoppressivo e comprende principalmente come cellule immunitarie i linfociti T regolatori (Treg), le cellule MDSC (*immature myeloid-derived suppressor cells*) ed i macrofagi associati al tumore (TAM) (Anderson E.M, et al., 2021).

Questi ultimi originano dai monociti circolanti che vengono reclutati nel sito tumorale, dove si differenziano in macrofagi associati al tumore, i quali possono assumere un fenotipo M1 o M2, a seconda degli stimoli del microambiente tumorale. Il loro reclutamento nei tumori è principalmente regolato da citochine, chemochine e fattori di crescita che vengono rilasciati dalle cellule tumorali e stromali (Cui R. et al., 2016).

Nel tessuto sano i fenotipi M1 e M2 coesistono in equilibrio tra loro; tuttavia nel contesto del PDAC e di altri tumori tale rapporto si sbilancia a favore del fenotipo M2. Al contrario, il fenotipo M1 sembra essere la popolazione dominante che si osserva nei tumori in regressione. Questa diversa espressione fenotipica è attribuita alla presenza di diverse citochine all'interno del TME: è stato scoperto, infatti, che l'espressione di alcune citochine "pro-tumorali" come il fattore di necrosi tumorale  $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ), l'interleuchina 6 (IL-6) e l'interleuchina 8 (IL-8) promuovono la crescita e la metastasi del tumore, mentre altre citochine "antitumorali", come interleuchina 4 (IL-4), interleuchina 13 (IL-13) ed interleuchina 10 (IL-10) supportano un ambiente anti-infiammatorio e sopprimono le risposte immunitarie adattative (Anderson E.M. et al., 2021).

Si ritiene che la transizione del fenotipo macrofagico da M1 a M2 costituisca un evento decisivo nell'inizio e nella progressione del tumore. I TAM infatti favoriscono lo sviluppo del tumore sopprimendo la risposta immunitaria antitumorale, stimolando la vascolarizzazione, l'invasione metastatica e aumentando la cancerogenicità delle cellule staminali tumorali. Circa l'80% dei tumori ha mostrato una correlazione positiva tra prognosi infausta e TAM, rispetto alla prognosi più favorevole dimostrata dai tumori con densità inferiore al 10 % di TAM. Se è vero che i TAM polarizzati M2 nello stroma sono fortemente correlati con i tumori localizzati nella coda e nel corpo del pancreas, una loro più elevata presenza è associata ad un aumentato rischio di metastasi linfonodali, invasione neurale, chemioresistenza, con peggiore prognosi e diminuita sopravvivenza nel PDAC (Cui R. et al., 2016).

Il forte tropismo dei monociti e dei macrofagi dimostrato nei confronti del microambiente tumorale ha indotto lo sviluppo di studi per valutare la loro capacità di fungere da cellule *carrier* per i virus oncolitici (Muthana M. et al., 2013).

Un esempio è fornito da una ricerca condotta da *Bunuales et al* sui monociti umani primari e su una linea cellulare di monociti/macrofagi di criceto siriano (HM-1) utilizzati come cellule *carrier* per l'adenovirus oncolitico (oAdV) in topi nudi con tumori umani (linea cellulare di epatocarcinoma HuH) e criceti immunocompetenti con tumore pancreatico di criceto, rispettivamente. I monociti umani appena isolati hanno migliorato la biodistribuzione di oAdV nei topi nudi mediante iniezione endovenosa, mentre l'iniezione di cellule di criceto HM-1 ha provocato l'accumulo di oAdV nel fegato. La biodistribuzione *in vivo* è stata misurata tramite l'utilizzo della luciferasi presente nel vettore adenovirale. Gli autori hanno concluso che le cellule *carrier* selezionate non erano adatte per la somministrazione sistemica in un modello animale immunocompetente e hanno scelto di utilizzare le cellule HM-1 come cellule *carrier* per la somministrazione intratumorale dell'adenovirus oncolitico. In questo contesto hanno dimostrato che la somministrazione intratumorale di OV mediata da HM-1 consentiva l'espressione genica terapeutica ripetuta dopo iniezioni multiple, che risultava più efficiente rispetto alle iniezioni con il virus nudo. Tuttavia una limitazione di questo studio consiste nel fatto che anche i macrofagi non infettati dal virus appartenenti alla linea cellulare HM-1 non sono riusciti ad infiltrarsi nel tumore pancreatico, non imitando quindi il reale comportamento biologico dei TAM. L'utilizzo di monociti primari al posto di una linea cellulare di macrofagi avrebbe portato potenzialmente ad una migliore infiltrazione (Reale A. et al., 2021).





### 3. SCOPO DELLA TESI

L'adenocarcinoma duttale del pancreas (PDAC) è un tumore particolarmente aggressivo che costituisce oltre il 90% di tutte le neoplasie pancreatiche. Accanto alle tradizionali opzioni terapeutiche attualmente disponibili, la viroterapia oncolitica costituisce una promettente strategia alternativa per il trattamento di questa forma di cancro. Questo approccio terapeutico si basa sull'utilizzo di virus nella loro forma *wild type* o geneticamente modificati, in grado di replicarsi selettivamente nelle cellule tumorali e di provocarne la morte per lisi, senza tuttavia danneggiare le cellule circostanti sane. I virus oncolitici, inoltre, modulano il microambiente immunosoppressivo che caratterizza il PDAC mediante la stimolazione del sistema immunitario.

In questa tesi è stato utilizzato il virus oncolitico oHSV-1 EGFP basato su HSV-1, uno dei virus più studiati come vettore per la viroterapia oncolitica, grazie alla presenza all'interno del suo genoma di geni non essenziali che possono essere deleti e sostituiti con transgeni favorenti la replicazione selettiva nelle cellule tumorali. Il virus oHSV-1 EGFP presenta, in particolare, lo stesso *backbone* genomico di T-VEC, un HSV-1 oncolitico approvato da parte della *Food and Drug Administration* (FDA) e dalla Commissione Europea per la viroterapia oncolitica. T-VEC presenta le delezioni nei geni  $\gamma$  34.5, che rendono la replicazione del virus selettiva per le cellule tumorali e la delezione del gene  $\alpha$ 47, che codifica una proteina coinvolta nei processi di immunoevasione condotti da HSV-1. Inoltre, è presente il gene GM-CSF (*granulocyte-macrophage colony stimulating factor*) inserito nei loci  $\gamma$  34.5 eliminati, codificante una citochina che potenzia la risposta immunitaria contro le cellule tumorali. Il virus oHSV-1 EGFP, a differenza di T-VEC, non presenta il gene GM-CSF, ma nella regione intergenica UL55-UL56 è stato inserito il transgene codificante la proteina *Enhanced Green Fluorescent Protein* (EGFP), sotto il controllo del promotore CMV (*Immediate Early Cytomegalovirus*). In questo modo è stato possibile monitorare la replicazione del virus tramite l'utilizzo del microscopio a fluorescenza.

Questo lavoro sperimentale si è principalmente focalizzato sulla valutazione della capacità del virus oHSV1-EGFP di replicarsi e di uccidere due linee di adenocarcinoma pancreatico oggetto di studio (linea cellulare HPAF e la linea cellulare BxPC3). I dati ottenuti hanno confermato quelli precedentemente ottenuti in laboratorio su cellule di glioblastoma umano e murino, evidenziando una differente permissività da parte delle due linee cellulari nei confronti dell'infezione virale.

Il secondo scopo di questa tesi è stato quello di valutare, tramite studi *in vitro*, la capacità dei monociti di fungere da cellule *carrier* per trasportare l'OV nel sito tumorale. La principale via di somministrazione dei virus oncolitici è quella intratumorale, che tuttavia presenta delle problematiche legate soprattutto al raggiungimento di metastasi disseminate e di tumori situati in zone di difficile accesso. D'altro canto, la somministrazione sistemica, pur risultando più pratica

rispetto a quella intratumorale, presenta anch'essa degli ostacoli che possono comprometterne l'efficacia. Si tratta soprattutto della presenza di anticorpi presenti nella circolazione sanguigna che possono legare e neutralizzare il virus prima che possa raggiungere il sito tumorale di interesse. Una strategia proposta per ovviare a questi ostacoli consiste nell'utilizzo dei monociti come cellule *carrier*: essi, infatti, possono proteggere i virus oncolitici dall'attacco del sistema immunitario, e presentando un forte tropismo nei confronti dei siti tumorali, possono far in modo che i virus oncolitici raggiungano il sito metastatico/tumorale senza essere neutralizzati dagli anticorpi circolanti. Nella prospettiva di valutare l'efficacia di questo sistema di *delivery*, è stata analizzata la diversa suscettibilità dei monociti all'infezione del virus  $\Delta\gamma34.5/\Delta U_s12/EGFP$ -oHSV1 in condizioni sperimentali diverse, paragonando la replicazione virale in monociti coltivati in terreni condizionati dalla crescita delle cellule di adenocarcinoma pancreatico HPAF ed in monociti primari coltivati in terreno non condizionato. I dati che sono stati ottenuti, seppur limitati ad una sola linea cellulare di adenocarcinoma ed ancora preliminari, confermano i risultati precedentemente ottenuti in laboratorio utilizzando linee cellulari di glioblastoma e di carcinoma della mammella. I monociti possono essere considerati come una valida strategia per veicolare il virus oncolitico preso in esame nei siti pancreatici tumorali.

## 4. MATERIALI E METODI

### 4.1 MATERIALI

#### 4.1.1 CEPPO VIRALE

In questo lavoro sperimentale è stato utilizzato il ceppo virale  $\Delta\gamma34.5/\Delta Us12/EGFP$ -oHSV1 (oHSV1-EGFP), prodotto nel laboratorio in cui è stato svolto il progetto di tesi. Trattasi di un virus ricombinante, caratterizzato dalla delezione sia della duplice copia del gene  $\gamma34.5$  sia del gene Us12, codificante la proteina ICP47. Nella regione intergenica UL55- UL56, inoltre, è stato inserito il transgene codificante la proteina *Enhanced Green Fluorescent Protein* (EGFP), sotto il controllo del promotore CMV (*Immediate Early Cytomegalovirus*).

#### 4.1.2 LINEE CELLULARI

In questo lavoro di Tesi sono state impiegate le seguenti linee cellulari:

**HPAF** (ATCC CRL-1997<sup>TM</sup>) è una linea cellulare derivata dal liquido ascitico peritoneale di un paziente caucasico di 44 anni, affetto da adenocarcinoma pancreatico duttale primario, con metastasi al fegato, diaframma e linfonodi.

**BxPC3** (ATCC CRL-1687<sup>TM</sup>) è una linea cellulare isolata dal tessuto pancreatico di una paziente di 61 anni, con adenocarcinoma duttale pancreatico primario.

Entrambe le linee cellulari sopra descritte crescono in adesione e sono state coltivate nel terreno RPMI 1640 (*Rosewell Park Memorial Institute 1640 Medium*), supplementato con 10% v/v di FBS e 1% v/v di penicillina/streptomicina.

**VERO** (ATCC CCL-81<sup>TM</sup>) sono cellule derivate dall'epitelio renale di una scimmia verde africana, *Cercopithecus aethiopsis*. Trattasi di cellule utilizzate in laboratorio per varie applicazioni, tra cui l'isolamento, l'amplificazione e la titolazione di diversi virus. Queste cellule crescono in adesione e sono state coltivate e mantenute nel terreno DMEM (*Dulbecco's Modified Eagle Medium, high glucose*) (Gibco), supplementato con il 10% v/v di Siero Fetale Bovino (FBS) (Gibco), e 1% v/v di penicillina/streptomicina (Gibco).

**MONOCITI PRIMARI** sono stati isolati a partire da *buffy coat*, proveniente dal sangue periferico di donatori sani, risultati negativi per i test di screening dei virus HIV, HBV e HCV. Queste cellule crescono in adesione sulla superficie della fiasca, e sono state mantenute nel terreno RPMI 1640 (*Rosewell Park Memorial Institute 1640 Medium*) (Gibco), supplementato con il 10% v/v di FBS, e 1% v/v penicillina/streptomicina.

**HEK-293T** (ATCC CRL-261<sup>TM</sup>) è una linea cellulare prodotta da cellule renali embrionali renali. Trattasi di cellule che crescono in adesione e sono state coltivate in terreno DMEM (*Dulbecco's Modified Eagle Medium, high glucose*) (Gibco),

supplementato con il 10% v/v di Siero Fetale Bovino (FBS) (Gibco), e 1% v/v di penicillina/streptomicina (Gibco).

## **4.2 METODI**

### **4.2.1 RICOSTITUZIONE DEL VIRUS $\alpha$ HSV1-EGFP MEDIANTE TRASFESIONE IN CELLULE HEK-293T ED AMPLIFICAZIONE DEL VIRUS IN CELLULE VERO**

La ricostituzione del ceppo virale di interesse è avvenuta grazie alla trasfezione delle cellule renali embrionali umane HEK-293T. Il processo di trasfezione prevede l'utilizzo della Lipofectamine 2000 (ThermoFisher), una molecola cationica che forma complessi con il DNA, carico negativamente, facilitandone il rilascio all'interno delle cellule. Precedentemente rispetto al processo di trasfezione, è stata seminata una fiasca T25 (con superficie di crescita di 25 cm<sup>2</sup>) di HEK-293T in DMEM 10% v/v FBS, in modo da raggiungere una confluenza dell'80% dopo 24 ore. Il giorno successivo sono state quindi preparate le seguenti soluzioni: in una eppendorf sono stati aggiunti 20  $\mu$ l di Lipofectamine e 480  $\mu$ l di terreno Opti-MEM, in un'altra eppendorf 7  $\mu$ l di DNA BAC, corrispondente ad 1  $\mu$ g, e 497  $\mu$ l di Opti-MEM. Le soluzioni sono state successivamente unite ed incubate a temperatura ambiente per dieci minuti, per consentire la formazione dei complessi lipide-DNA. Sono stati poi aggiunti alle cellule 4 ml di terreno Opti-MEM. In seguito le fiasche T25 sono state incubate a 37°C O/N, per poi sostituire il giorno successivo il terreno vecchio con DMEM 10% v/v FBS. Le cellule sono state monitorate al microscopio i giorni successivi per osservare e valutare l'effetto citopatico. Quando l'effetto citopatico indotto dal virus ha coinvolto circa il 90% del monostrato, il sovrannatante è stato raccolto, centrifugato per eliminare i detriti cellulari e quindi utilizzato per infettare la linea cellulare Vero. Al fine di amplificare il ceppo virale in questione, infatti, le particelle virali ottenute dalla trasfezione delle cellule HEK-293T sono state amplificate nella linea cellulare Vero, con l'obiettivo di generare uno stock virale. In seguito all'amplificazione del virus, il titolo di  $\alpha$ HSV1-EGFP è stato determinato tramite il saggio di titolazione per placche, approfondito nel paragrafo 4.2.3.

### **4.2.2 SAGGIO DI REPLICAZIONE VIRALE NELLE CELLULE DI ADENOCARCINOMA PANCREATICO HPAF E BxPC3**

Queste due linee cellulari, crescendo in adesione sulla superficie della fiasca, sono state innanzitutto staccate attraverso l'utilizzo di tripsina, e poi contaminate tramite la camera di Bürker. Le cellule sono state successivamente seminate in 2 piastre da 24 pozzetti, in modo da avere 1 x 10<sup>5</sup> cellule per pozzetto. Il giorno seguente le cellule sono state lavate con DPBS, infettate con il terreno DMEM senza siero ed il virus  $\Delta\gamma$ 34.5/ $\Delta$ Us12/EGFP- $\alpha$ HSV1 ( $\alpha$ HSV1-EGFP) a diverse molteplicità d'infezione MOI (*Multiplicity Of Infection*), e poi lasciate in incubazione per 1 ora a 37° C. Dopo aver lavato ciascun pozzetto infettato con DPBS (*Dulbecco's phosphate-buffered saline*), è stato aggiunto il terreno RPMI con 10 % v/v di FBS e 1 % di v/v di penicillina/streptomicina. Le piastre sono state incubate a 37°C, per poi

raccogliere i surnatanti a diversi tempi dopo l'infezione. In seguito al prelievo dei surnatanti, sono stati aggiunti in ciascun pozzetto infettato 500 µl di terreno RPMI con 10% v/v di FBS e 1% v/v di penicillina/streptomina. I surnatanti sono stati conservati a -80°C. Grazie alla proteina fluorescente EGFP è stato possibile osservare l'andamento dell'infezione, utilizzando il microscopio a fluorescenza (*Leica Epifluorescence DC 100*).

#### **4.2.3 SAGGIO DI TITOLAZIONE VIRALE ATTRAVERSO CONTEGGIO DELLE PLACCHE**

Il saggio di titolazione per placche permette di stimare la quantità di particelle virali infettive presenti nei surnatanti delle cellule infettate, ottenendo un titolo che viene espresso come Unità formanti placche su millilitro (PFU/ml). Questa tecnica permette di titolare sia i surnatanti ottenuti con gli esperimenti di infezione delle cellule sia gli stock virali ottenuti con l'amplificazione del virus. In questo saggio vengono utilizzate piastre da 48 pozzetti, in cui vengono seminate le cellule Vero ( $5 \times 10^4$  per pozzetto), in terreno DMEM al 10% v/v di FBS e 1% di penicillina/streptomina. Le cellule vengono successivamente incubate per 24 ore a 37° C. Dopo aver verificato che le cellule siano confluenti sul fondo del pozzetto, sono state infettate con i campioni contenenti i surnatanti virali, diluendoli in terreno DMEM senza siero. In seguito all'ora di incubazione a 37°C, le sospensioni virali sono state rimosse, ed è stato eseguito un lavaggio con DPBS 1X per ciascun pozzetto, in modo da eliminare le eventuali particelle virali rimaste sul fondo del pozzetto. In seguito, sono stati aggiunti 250 µl per pozzetto di terreno DMEM con 2% v/v di FBS, supplementato con 0.75 % v/v di carbossi -metil- cellulosa. Questo terreno essendo viscoso, impedisce alle particelle virali di diffondersi in cellule diverse dal sito di infezione primario. Dopo 72 ore di incubazione a 37°C, è stato rimosso il terreno DMEM con 2% di FBS, supplementato con 0.75% v/v di carbossi- metil- cellulosa, ed è stato effettuato un lavaggio con DPBS per eliminare eventuali residui di terreno. Successivamente le cellule sono state fissate con una soluzione di acqua deionizzata al 5 % v/v di formaldeide, incubando per 10 minuti a temperatura ambiente. In seguito, le cellule sono colorate con una soluzione a 0.2% v/v di cristalvioletto, incubando per 5 minuti a temperatura ambiente. Infine, i pozzetti sono stati lavati con acqua deionizzata per rimuovere il colorante in eccesso e facilitare la conta delle placche. Quest'ultime sono state contate al microscopio ottico, e per ottenere il titolo virale è stata applicata la seguente formula:

Titolo (PFU/ml) = (media delle placche x diluizione virale) / volume totale dell'infezione

#### **4.2.4 ISOLAMENTO E PURIFICAZIONE DEI MONOCITI CON EASYSEP™ MAGNET**

In questo lavoro di tesi, al fine di poter isolare i monociti dalle altre componenti del sangue presenti nel *buffy coat*, è stato utilizzato un kit che permette di riconoscere

il marcatore di superficie CD14, presente sulla superficie dei monociti, tramite l'utilizzo di anticorpi associati a particelle magnetiche (*Easysep<sup>TM</sup> Magnet*). Il procedimento consiste per prima cosa nel dividere il *buffy coat* in due falcon da 50 ml ed il sangue in esso contenuto è stato diluito 1:2 con DPBS. Le falcon sono state quindi centrifugate per 10 minuti a temperatura ambiente (25°C). Conclusa la centrifuga è stato possibile osservare un anello di leucociti, che è stato poi trasferito in un tubo sterile. Successivamente è stato aggiunto il buffer *Easysep<sup>TM</sup> RBS Lysis* (1X) nello stesso volume del campione, al fine di poter lisare gli eritrociti. Sono stati poi aggiunti 750 µl di *Selection Cocktail*, per poi mescolare ed incubare per 3 minuti. In seguito sono stati aggiunti al campione 750 µl di biglie magnetiche, per poi mescolare ed incubare per 3 minuti come in precedenza. Il processo di isolamento è proseguito con l'aggiunta di 5 ml di DPBS per poi procedere con l'incubazione per 3 minuti, ripetute per due volte. Il DPBS aggiunto viene quindi eliminato e le cellule sono state risospese in 1 ml di terreno RPMI supplementato con 10% v/v di FBS ed 1 % v/v di penicillina/streptomicina. A questo punto le cellule isolate sono pronte per poter essere utilizzate e possono essere contate con la camera di Bürker in modo da valutare il numero di monociti isolati.

#### **4.2.5 SAGGIO DI REPLICAZIONE VIRALE NEI MONOCITI PRIMARI COLTIVATI IN TERRENI CONDIZIONATI DALLE CELLULE HPAF**

Al fine di poter ottenere i terreni condizionati dalla crescita di questa linea cellulare di adenocarcinoma pancreatico, le cellule HPAF sono state tenute in coltura per tre giorni in fiasche T75, in 10 ml del terreno RPMI supplementato con 10% v/v di FBS ed 1% v/v di penicillina/streptomicina. In seguito il surnatante è stato filtrato tramite l'utilizzo di una siringa sterile ed un filtro sterile per la siringa, che presenta una membrana in PVDF (polivinilidenefluoruro) con pori caratterizzati da un diametro di 0.45 µm, finalizzati ad eliminare probabili detriti cellulari nel surnatante prelevato. Questi terreni, contenenti fattori di crescita delle cellule tumorali HPAF, vengono conservati a -20°C fino al loro utilizzo. Una volta ottenuti questi terreni condizionati dalle cellule HPAF, i monociti sono stati contati con la camera di Bürker, e successivamente infettati con il virus oHSV1-EGFP alla MOI di 5 PFU/cellula, considerando di avere  $1 \times 10^5$  cellule/pozzetto per 6 pozzetti. Dopo 1 ora di infezione a 37°C, le cellule sono state centrifugate a 1500 rpm per 5' ed il surnatante è stato scartato. I monociti infettati sono stati in seguito risospesi in terreni diversi: terreno condizionato da cellule HPAF e terreno RPMI al 10% v/v di FBS e 1 % v/v di penicillina/streptomicina. Infine, le cellule infettate sono state seminate in una piastra da 24 pozzetti, seminando 3 pozzetti per ciascuna diversa condizione sperimentale. I surnatanti sono stati raccolti ai tempi di 24, 48 e 72 ore di infezione, e conservati a -80°C per poi essere titolati. L'andamento dell'infezione è stato monitorato grazie all'utilizzo del microscopio a fluorescenza.

## 5. RISULTATI

### 5.1 RICOSTITUZIONE, AMPLIFICAZIONE E TITOLAZIONE DEL VIRUS $\alpha$ HSV1-EGFP

In questo lavoro di tesi è stato utilizzato il virus  $\Delta\gamma34.5/\Delta Us12/EGFP-\alpha$ HSV1 ( $\alpha$ HSV1-EGFP), il ceppo virale di HSV esprime la proteina fluorescente EGFP ottenuto tramite ricombinazione omologa utilizzando la tecnologia del BAC (cromosoma batterico artificiale). Una rappresentazione schematica del virus utilizzato è riportata in figura 8. Il processo di ricostituzione del ceppo virale di interesse si è verificato grazie all'utilizzo delle cellule renali embrionali umane HEK-293T, che sono state trasfettate con un BAC contenente il genoma di HSV-1 ceppo 17, caratterizzato dalla delezione sia della duplice copia del gene  $\gamma34.5$  sia del gene *Us12*, codificante la proteina ICP47. Nella regione intergenica UL55-UL56, inoltre, è stato inserito il transgene codificante la proteina *Enhanced Green Fluorescent Protein* (EGFP), sotto il controllo del promotore CMV (*Immediate Early Cytomegalovirus*). Il processo di trasfezione prevede l'utilizzo della lipofezione. In seguito alla trasfezione mediante le cellule HEK 293T, queste ultime sono state incubate e frequentemente monitorate al microscopio per valutare l'effetto citopatico. Quando l'effetto citopatico indotto dal virus ha coinvolto circa il 90% del monostrato, il sovratanante è stato raccolto, centrifugato per eliminare i detriti cellulari e quindi utilizzato per infettare la linea cellulare Vero, allo scopo di amplificare il ceppo virale. In seguito all'infezione, le cellule sono state incubate e frequentemente monitorate al microscopio per valutare l'effetto citopatico. Nel momento in cui è risultato distrutto circa il 90% del monostrato cellulare, il terreno è stato raccolto ed utilizzato per un altro ciclo di amplificazione su cellule Vero. Una volta raggiunto il 90% della distruzione cellulare legata all'effetto citopatico virale, il sovratanante è stato rimosso e le cellule sono state staccate dal fondo della fiasca attraverso l'utilizzo di uno *scraper*. Il pellet cellulare è stato centrifugato a 1500 rpm per 4 minuti a 4°C. Il surnatante ottenuto è stato scartato mentre il pellet cellulare è stato risospeso in 300  $\mu$ l di DMEM 10% v/v FBS. La sospensione cellulare è stata sottoposta a quattro cicli di congelamento in ghiaccio secco seguiti da scongelamento a 37°C, in modo da rompere le membrane cellulari. I detriti cellulari sono stati eliminati tramite centrifugazione a 11000 rpm per 15' a 4°C. Le aliquote ottenute sono state conservate a -80°C. In seguito all'amplificazione del virus, il suo titolo virale è stato determinato tramite il saggio di titolazione a placche (paragrafo 4.2.3, Capitolo Materiali e Metodi), ottenendo come titolo  $2,4 \times 10^8$  PFU/ml.



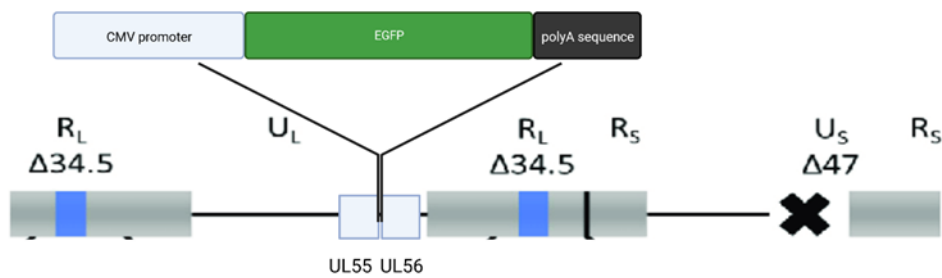


Figura 8. Rappresentazione schematica del genoma di HSV-1 ceppo 17. Il genoma è caratterizzato dalla delezione sia della duplice copia del gene  $\gamma$ 34.5 sia del gene  $U_s12$ , codificante la proteina ICP47. Nella regione intergenica UL55- UL56, inoltre, è stato inserito il transgene codificante la proteina *Enhanced Green Fluorescent Protein* (EGFP).

## 5.2 VALUTAZIONE DELLA CAPACITÀ DI REPLICAZIONE DEL VIRUS $\alpha$ HSV-1 EGFP NELLA LINEA CELLULARE TUMORALE BxPC3

Questo lavoro di tesi è principalmente focalizzato sulla valutazione della capacità di replicazione del virus  $\alpha$ HSV-1 EGFP nelle linee di adenocarcinoma pancreatico oggetto di studio. Trattasi di linee cellulari con diverse caratteristiche molecolari, che sono particolarmente utilizzate per lo studio dell'adenocarcinoma duttale del pancreas. Innanzi tutto, le cellule tumorali BxPC3 sono state infettate con il virus  $\alpha$ HSV-1 EGFP ad una molteplicità di infezione (MOI) pari a 0.1 unità formanti placca (PFU)/cellula. In seguito, i surnatanti sono stati raccolti a diversi tempi dopo l'infezione e i virioni in essi rilasciati sono stati analizzati quantitativamente tramite l'utilizzo del saggio di titolazione per placche (paragrafo 4.2.3, Capitolo Materiali e Metodi). I titoli virali, rappresentati in figura 9, vengono espressi in unità formanti placche (PFU)/ml e consentono di stimare la quantità di virioni presenti nei surnatanti delle cellule tumorali precedentemente infettate.

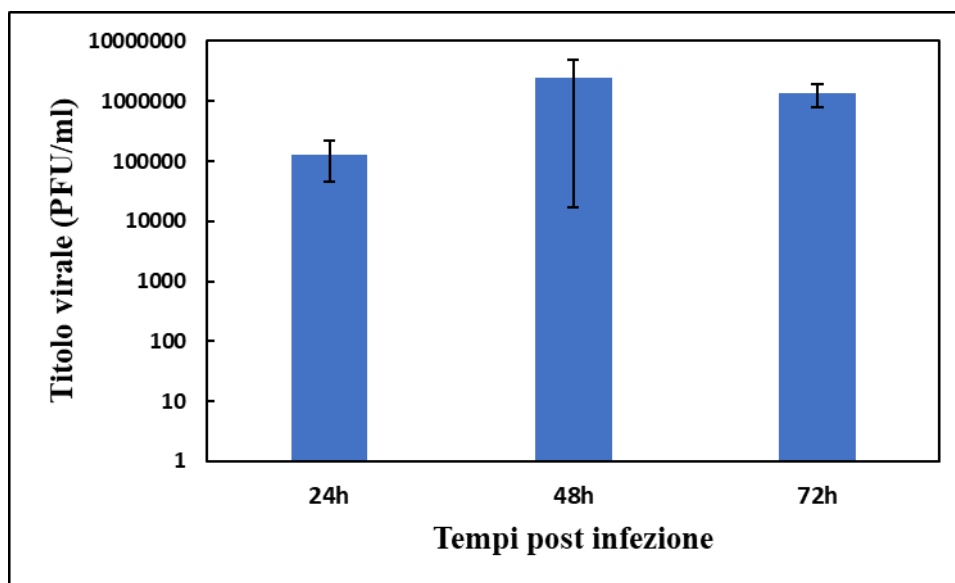
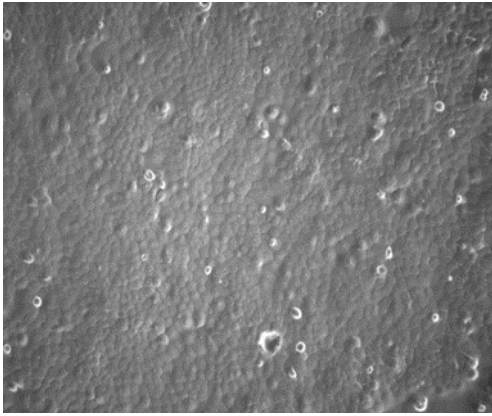
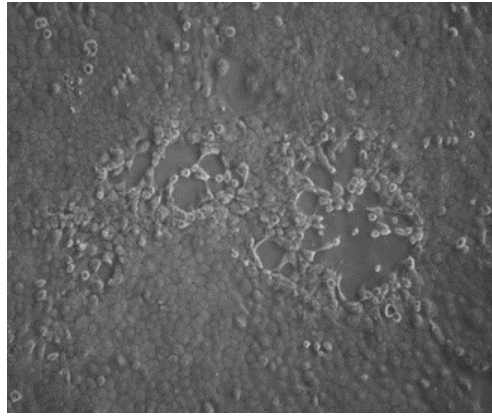


Figura 9. oHSV1-EGFP replica in cellule di adenocarcinoma pancreatico BxPC3. Rappresentazione del saggio di titolazione per placche dei surnatanti di cellule di adenocarcinoma pancreatico BxPC3 infettate con il virus oHSV1-EGFP a MOI 0.1 PFU/cellula. I surnatanti sono stati prelevati a 24 ore, 48 ore e 72 ore dall'inizio dell'infezione, per poi essere titolati. Nel grafico è presente lungo l'asse delle ordinate (Y) la media dei titoli virali di tre replicati, riportati in scala logaritmica per ciascun tempo post infezione, riportato lungo l'asse delle ascisse (X). Le barre di errore rappresentano le deviazioni standard campionarie.

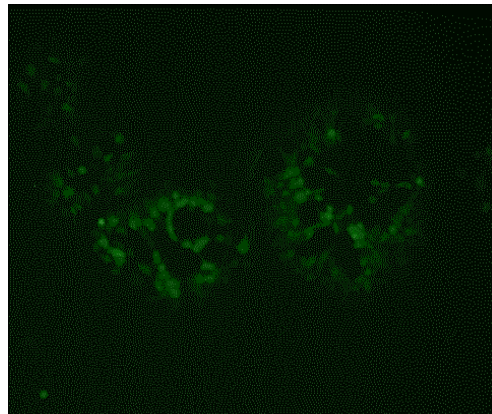
I dati riportati in figura 9 permettono di osservare un picco del titolo virale a 48 ore dall'inizio dell'infezione, che diminuisce a 72 ore dall'inizio dell'infezione per la morte cellulare causata dal virus. La capacità replicativa del virus in questa linea cellulare viene monitorata mediante l'utilizzo del microscopio a fluorescenza, che consente anche di osservare l'effetto citopatico dovuto all'azione del virus oHSV1-EGFP già a 24 ore dall'inizio dell'infezione (Figura 10).



**a**



**b**



**c**

Figura 10. oHSV1-EGFP replica in cellule di adenocarcinoma pancreatico BxPC3. a) Cellule BxPC3 non infettate: rappresentano il controllo negativo del saggio, ingrandimento 10x al microscopio a fluorescenza, luce visibile; b) cellule BxPC3 infettate con il virus oHSV1-EGFP a MOI 0.1 PFU/cellula a 24 ore dall'inizio dell'infezione, ingrandimento 10x al microscopio a fluorescenza, luce visibile; c) cellule BxPC3 infettate con il virus oHSV1-EGFP a MOI 0.1 PFU/cellula a 24 ore dall'inizio dell'infezione, ingrandimento 10x al microscopio a fluorescenza, fluorescenza verde.

Per valutare la capacità replicativa del virus oHSV1-EGFP nelle cellule tumorali BxPC3 ad una molteplicità di infezione più elevata, questa linea cellulare è stata ulteriormente infettata con lo stesso virus ad una molteplicità di infezione (MOI) pari a 1 unità formanti placca (PFU)/cellula. In seguito, i surnatanti sono stati raccolti a diversi tempi dall'inizio dell'infezione e poi titolati con il saggio di titolazione per placche, come precedentemente esposto. Il grafico seguente mostra la diminuzione del titolo virale a 48 ore ed a 72 ore dall'inizio dell'infezione dovuto alla morte delle cellule tumorali causata dall'azione del virus. Si può quindi concludere che questa linea cellulare di adenocarcinoma pancreatico risulta essere particolarmente permissiva all'infezione virale.

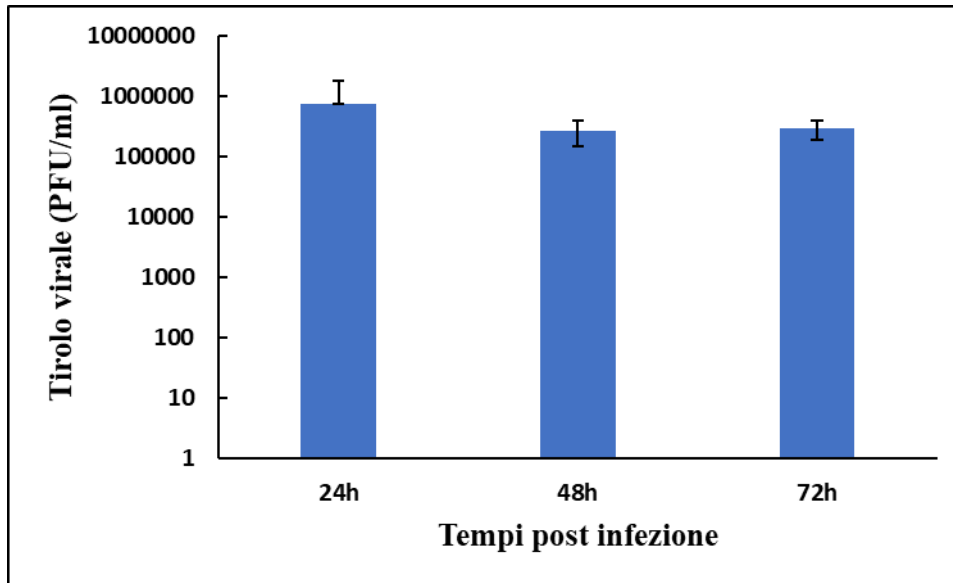
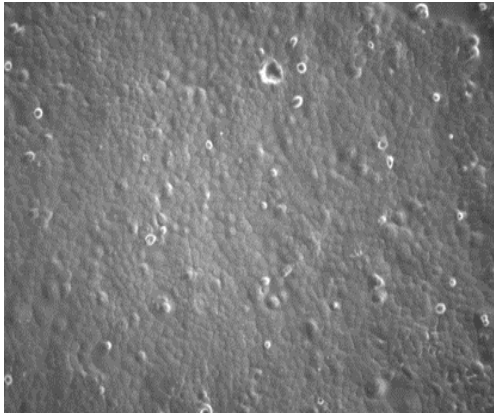
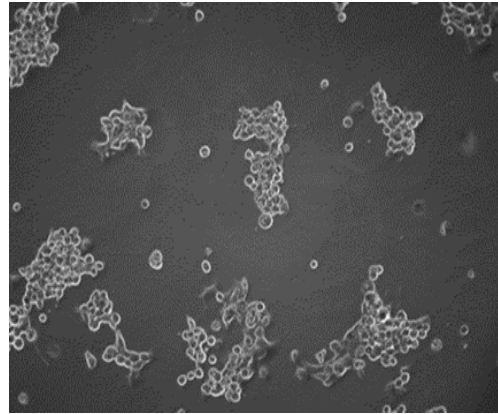


Figura 11. oHSV1-EGFP replica in cellule di adenocarcinoma pancreatico BxPC3. Rappresentazione del saggio di titolazione per placche dei surnatanti di cellule di adenocarcinoma pancreatico BxPC3 infettate con il virus oHSV1-EGFP a MOI 1 PFU/cellula. I surnatanti sono stati prelevati a 24 ore, 48 ore e 72 ore dall'inizio dell'infezione, per poi essere titolati. Nel grafico è presente lungo l'asse delle ordinate (Y) la media dei titoli virali di tre replicati, i quali sono riportati in scala logaritmica per ciascun tempo post infezione, riportato lungo l'asse delle ascisse (X). Le barre di errore rappresentano le deviazioni standard campionarie.

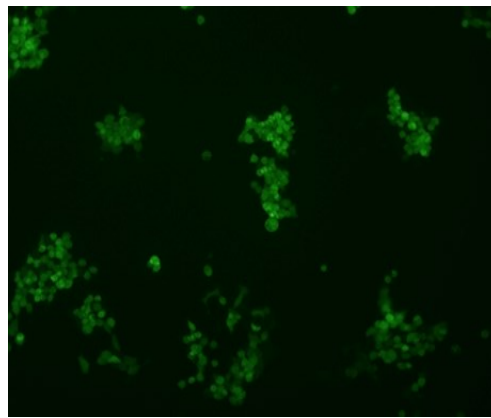
Anche in questo caso, la capacità replicativa del virus viene osservata utilizzando il microscopio a fluorescenza, che mette in risalto l'effetto citopatico causato dall'azione virale (Figura 12). Le cellule infatti presentano una morfologia rotondeggiante a 24 ore dall'inizio dell'infezione. Rispetto all'infezione delle cellule a MOI 0.1, con una molteplicità di infezione pari a 1, l'effetto citopatico risulta più evidente, come mostrato in figura 12.



**a**



**b**



**c**

Figura 12. oHSV1-EGFP replica in cellule di adenocarcinoma pancreatico BxPC3. a) Cellule BxPC3 non infettate, rappresentano il controllo negativo del saggio, ingrandimento 10x al microscopio a fluorescenza, luce visibile; b) cellule BxPC3 infettate con il virus oHSV1-EGFP a MOI 1 PFU/cellula a 24 ore dall'inizio dell'infezione, ingrandimento 10x al microscopio a fluorescenza, luce visibile; c) cellule BxPC3 infettate con il virus oHSV1-EGFP a MOI 1 PFU/cellula a 24 ore dall'inizio dell'infezione, ingrandimento 10x al microscopio a fluorescenza, fluorescenza verde.

### 5.3 VALUTAZIONE DELLA CAPACITA' DI REPLICAZIONE DEL VIRUS oHSV-1 EGFP NELLA LINEA CELLULARE TUMORALE HPAF

Le cellule tumorali HPAF riflettono delle caratteristiche cliniche diverse rispetto alla linea cellulare BxPC3: le prime infatti derivano da un paziente affetto da adenocarcinoma pancreatico primario con metastasi, mentre nelle seconde non vi è alcuna evidenza di metastasi. L'utilizzo di entrambe negli esperimenti permette di aumentare l'attendibilità dei risultati. Come le cellule BxPC3, anche le cellule tumorali HPAF sono state infettate con il virus oHSV-1 EGFP ad una molteplicità di infezione (MOI) pari a 1 unità formanti placca (PFU)/cellula. In seguito, i surnatanti sono stati raccolti a diversi tempi dopo l'infezione per poi essere titolati tramite l'utilizzo del saggio di titolazione per placche (paragrafo 4.2.3, Capitolo Materiali e Metodi). I titoli virali, rappresentati in figura 13, vengono espressi in unità formanti placche (PFU)/ml e consentono di stimare la quantità di virioni presenti nei surnatanti delle cellule tumorali precedentemente infettate.

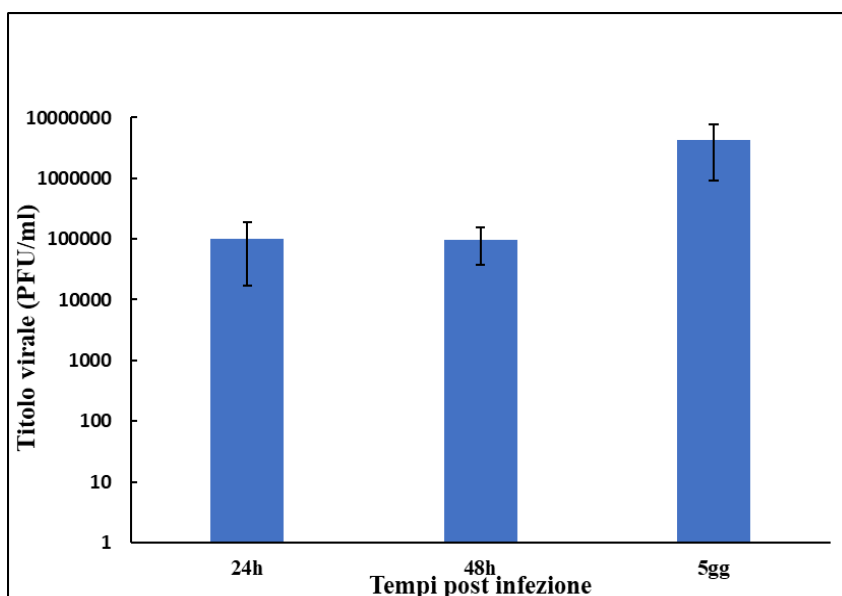


Figura 13. oHSV1-EGFP replica in cellule di adenocarcinoma pancreatico HPAF. Rappresentazione del saggio di titolazione per placche dei surnatanti di cellule di adenocarcinoma pancreatico HPAF infettate con il virus oHSV1-EGFP a MOI 1 PFU/cellula. I surnatanti sono stati prelevati a 24 ore, 48 ore e 5 giorni dall'inizio dell'infezione, per poi essere titolati. Nel grafico è presente lungo l'asse delle ordinate (Y) la media dei titoli virali di tre replicati, riportati in scala logaritmica per ciascun tempo post infezione lungo l'asse delle ascisse (X). Le barre di errore rappresentano le deviazioni standard campionarie.

Confrontando il grafico riportato in figura 13 con quello della figura 11, si può constatare come questa linea cellulare risulti essere più resistente all'infezione rispetto alla precedente (BxPC3): si osserva infatti un picco del titolo virale a 5 giorni dall'inizio dell'infezione. La minore suscettibilità all'infezione viene confermata anche dall'osservazione delle cellule tramite il microscopio a fluorescenza (figura 14), in cui, a 24 ore dall'inizio dell'infezione, la proteina fluorescente EGFP non risulta essere particolarmente espressa, come accadeva

invece nel caso delle cellule BxPC3 allo stesso tempo dopo l'infezione ed alla stessa molteplicità d'infezione.

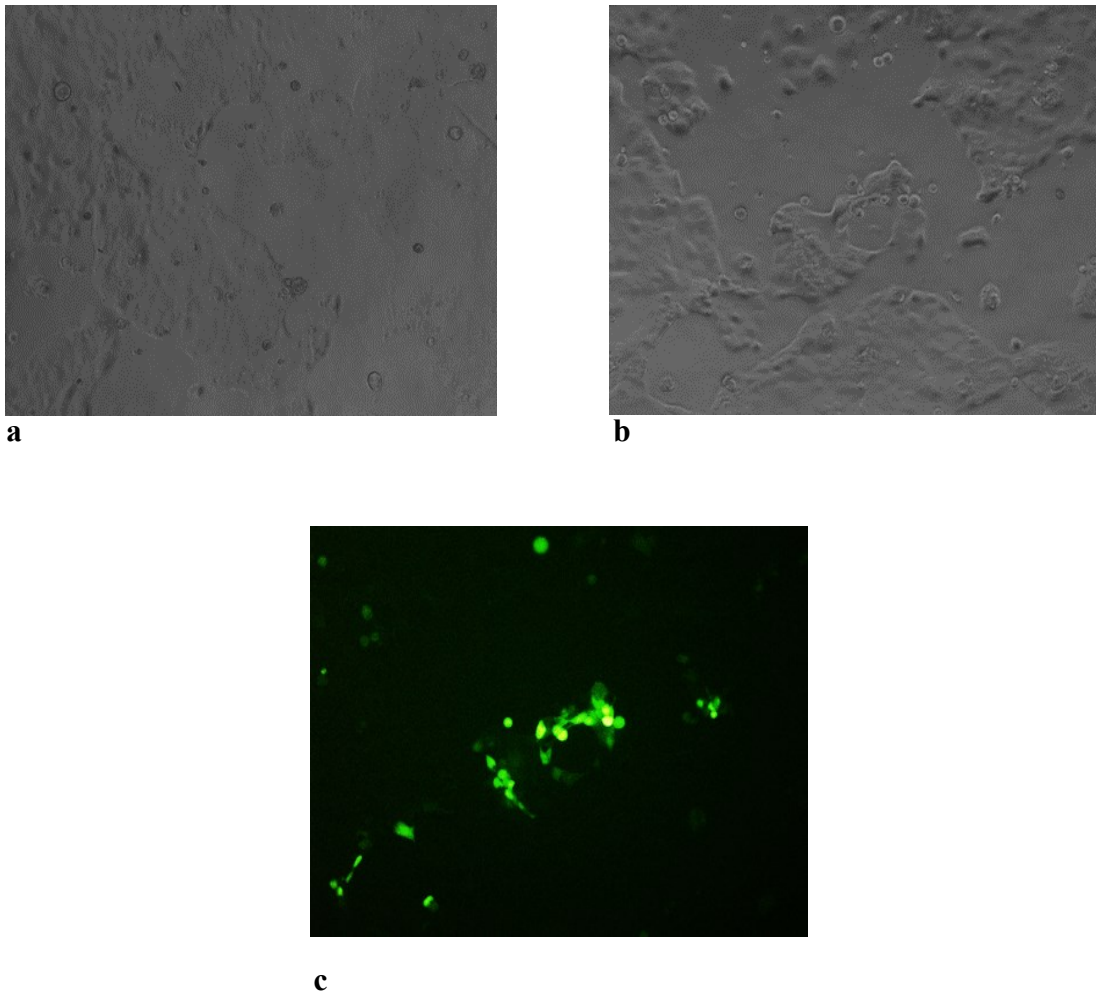
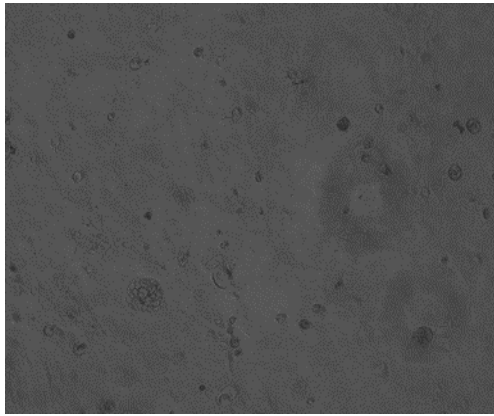


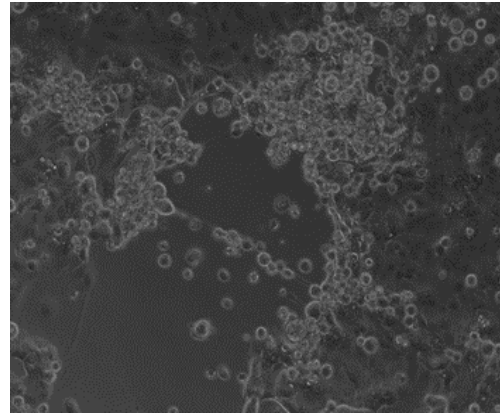
Figura 14. oHSV1-EGFP replica in cellule di adenocarcinoma pancreatico HPAF. a) Cellule HPAF non infettate, rappresentano il controllo negativo del saggio, ingrandimento 10x al microscopio a fluorescenza, luce visibile; b) cellule HPAF infettate con il virus oHSV1-EGFP a MOI 1 PFU/cellula a 24 ore dall'inizio dell'infezione, ingrandimento 10x al microscopio a fluorescenza, luce visibile; c) cellule HPAF infettate con il virus oHSV1-EGFP a MOI 1 PFU/cellula a 24 ore dall'inizio dell'infezione, ingrandimento 10x al microscopio a fluorescenza, fluorescenza verde.

In figura 15 è possibile osservare un maggior effetto citopatico dovuto all'azione virale a 48 ore dall'inizio dell'infezione.

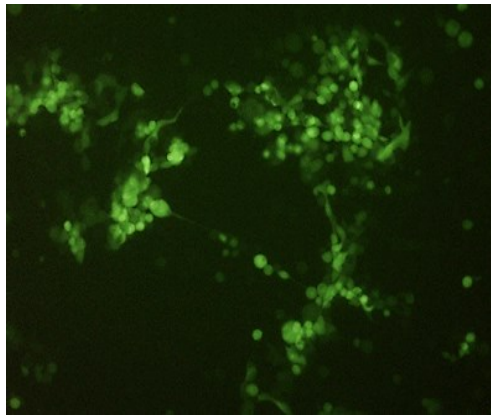




**a**



**b**



**c**

Figura 15. oHSV1-EGFP replica in cellule di adenocarcinoma pancreatico HPAF. 1) Cellule HPAF non infettate, rappresentano il controllo negativo del saggio, ingrandimento 10x al microscopio a fluorescenza, luce visibile; 2) cellule HPAF infettate con il virus oHSV1-EGFP a MOI 1 PFU/cellula a 48 ore dall'inizio dell'infezione, ingrandimento 10x al microscopio a fluorescenza, luce visibile; 3) cellule HPAF infettate con il virus oHSV1-EGFP a MOI 1 PFU/cellula a 48 ore dall'inizio dell'infezione, ingrandimento 10x al microscopio a fluorescenza, fluorescenza verde.

#### **5.4 ANALISI DEL POTENZIALE REPLICATIVO DI oHSV1-EGFP NEI MONOCITI COLTIVATI NEI TERRENI CONDIZIONATI DERIVATI DALLA CRESCITA DI CELLULE TUMORALI DI ADENOCARCINOMA PANCREATICO**

Al fine di testare la capacità dei monociti di fungere da cellule *carrier* e quindi di trasportare oHSV-1 nei siti tumorali di adenocarcinoma pancreatico, la linea cellulare di adenocarcinoma pancreatico HPAF è stata coltivata nel terreno di crescita RPMI supplementato con 10% v/v di FBS ed 1% v/v di penicillina/streptomina per tre giorni in una fiasca T75. Il sovrinatante condizionato dalla crescita delle cellule tumorali, è stato prelevato e conservato a -20°C fino al suo utilizzo. I monociti sono stati in seguito isolati e purificati (paragrafo 4.2.4, Capitolo Materiali e Metodi), per poi essere seminati ed infettati con il virus oHSV1-EGFP a MOI 5 PFU/cellula. Le cellule sono state infettate



considerando due condizioni sperimentali diverse: sono state coltivate sia nel terreno condizionato dalle cellule tumorali sia nel terreno non condizionato dai fattori di crescita tumorali (RPMI). Successivamente i surnatanti dei monociti infettati sono stati raccolti a 24, 48 e 72 ore dall'inizio dell'infezione, per essere poi titolati attraverso il saggio di titolazione per placche (paragrafo 4.2.3, Capitolo Materiali e Metodi). Esaminando il grafico sottostante è possibile osservare come a 72 ore dall'inizio dell'infezione la titolazione abbia un valore pari a zero in quanto con la conta delle placche (paragrafo 4.2.3, Capitolo Materiali e Metodi) si è ottenuto un valore pari a zero, mentre a 24 ed a 48 ore dall'inizio dell'infezione è possibile osservare un aumento del titolo virale nei monociti coltivati nei terreni condizionati dalle cellule tumorali HPAF rispetto al terreno non condizionato (RPMI). Questo risultato conferma i dati ottenuti in laboratorio su cellule di glioblastoma e cellule di carcinoma mammario: anche in questo caso infatti, la replicazione del virus nei monociti coltivati in terreni non condizionati rimane più limitata se paragonata all'aumento del titolo virale che si riscontra nel terreno condizionato dalle cellule tumorali HPAF. Ciò sembra essere legato alla presenza di fattori di crescita tumorali rilasciati da questa linea di adenocarcinoma pancreatico. Sono tuttavia necessari ulteriori studi ed esperimenti più approfonditi per individuare quali siano i fattori di crescita tumorali responsabili dell'aumento del titolo virale.

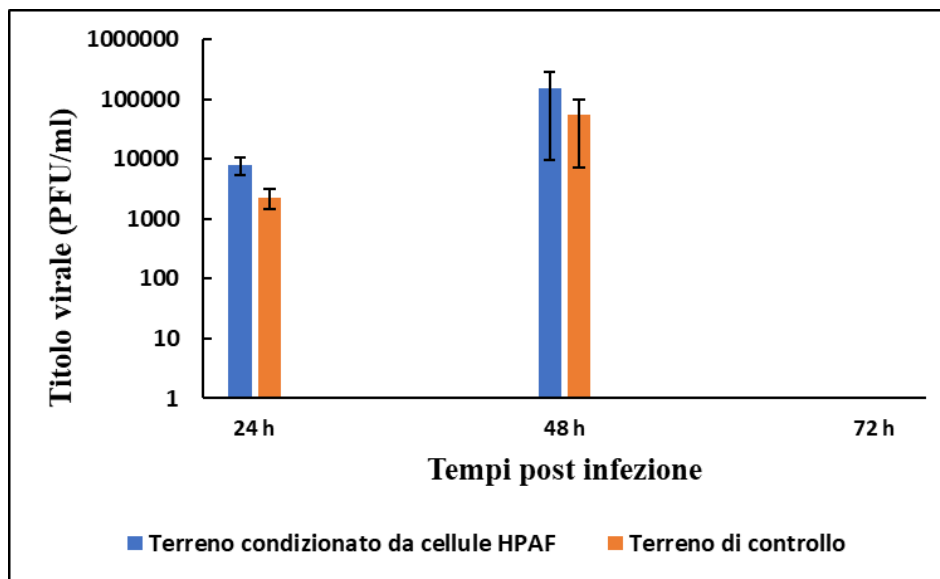


Figura 16.  $\alpha$ HSV1-EGFP replica nei monociti coltivati in terreni diversi. Rappresentazione del saggio di titolazione per placche dei surnatanti di monociti infettati con il virus  $\alpha$ HSV1-EGFP a MOI 5 PFU/cellula. I surnatanti sono stati prelevati a 24 ore, 48 ore e 72 ore dall'inizio dell'infezione, per poi essere titolati. Nel grafico è presente lungo l'asse delle ordinate (Y) la media dei titoli virali di tre replicati, riportati in scala logaritmica ed espressi in PFU/ml. Nell'asse delle ascisse (X) è riportata la diversa condizione di coltura dei monociti infettati: monociti coltivati nel terreno non condizionato supplementato con 10% v/v di FBS ed 1% v/v di penicillina/streptomina (terreno di controllo) e terreno condizionato dalla crescita delle cellule tumorali HPAF. Le barre di errore rappresentano le deviazioni standard campionarie.

## 6. DISCUSSIONE

L'adenocarcinoma duttale del pancreas (PDAC) è una neoplasia epiteliale estremamente invasiva che origina dalla trasformazione maligna delle cellule esocrine del pancreas, rappresentando oltre il 90% di tutti i tumori pancreatici. A causa della sua prognosi estremamente sfavorevole, della bassa sopravvivenza e dell'impatto molto elevato sulla mortalità associata al tumore, si stima che l'adenocarcinoma del pancreas (PDAC) diventerà la seconda causa di morte correlata al cancro entro il 2030, preceduta solo dal carcinoma polmonare (Tassone E. et al., 2020).

Fra gli attuali trattamenti standard di cura attualmente disponibili, la resezione chirurgica rimane una componente essenziale del trattamento di cura: tuttavia, nel momento in cui l'adenocarcinoma pancreatico (PDAC) viene diagnosticato, meno del 20% dei pazienti presenta un tumore resecabile. Nella maggior parte dei casi, infatti, i sintomi e segni associati a questa forma di cancro si manifestano quando la malattia è già progredita verso uno stadio avanzato. In assenza della possibilità di intervenire per via chirurgica, la radioterapia, in combinazione con la chemioterapia, costituiscono un'alternativa terapeutica per il trattamento del tumore metastatico non resecabile. Tuttavia, gli effetti raggiunti da entrambi gli approcci sono principalmente un lieve aumento del tasso di sopravvivenza ed una riduzione dei sintomi correlati al cancro (Anderson E.M. et al., 2021).

Accanto a queste tradizionali opzioni terapeutiche attualmente disponibili, che purtroppo non si sono dimostrate sufficientemente efficaci per combattere questa forma di cancro, l'immunoterapia ha dimostrato d'essere un altro importante metodo antitumorale oltre alla chirurgia ed alla chemioterapia. Le strategie di immunoterapia per il cancro al pancreas comprendono principalmente gli inibitori del *checkpoint* immunitario, vaccini, terapie cellulari adottive ed i virus oncolitici (OV) (Wu and Cai, 2021). La valutazione dell'impiego di questi ultimi a fini terapeutici è stato, in particolare, il principale oggetto di studio di questo lavoro di tesi.

La viroterapia oncolitica costituisce una promettente e non completamente esplorata strategia terapeutica per il trattamento dei tumori solidi, tra i quali l'adenocarcinoma duttale del pancreas (PDAC). Questo approccio terapeutico si basa sull'utilizzo di virus nella loro forma *wild type* o geneticamente modificati, in grado di replicarsi selettivamente nelle cellule tumorali e di provocarne la morte per lisi, senza tuttavia danneggiare le cellule circostanti sane (Fukuhara H. et al., 2016). L'infezione nelle cellule tumorali porta al rilascio di nuovi virioni maturi che possono infettare le cellule tumorali circostanti, portando ad una propagazione dell'effetto terapeutico. Inoltre, la lisi delle cellule tumorali mediata dai virus oncolitici è solitamente associata al rilascio di antigeni associati al tumore, *pattern* molecolari associati al pericolo (DAMPs) e vari *pattern* molecolari associati ai patogeni (PAMPs) che stimolano un'efficiente risposta immunitaria sistemica antitumorale (Ylösmäki and Cerullo, 2020).

L'efficacia della viroterapia oncolitica per il trattamento dell'adenocarcinoma duttale del pancreas viene particolarmente ostacolata dalla presenza di un

microambiente tumorale (TME) particolarmente immunosoppressivo, prevalentemente occupato da cellule immunosoppressive come i macrofagi associati al tumore (TAM) ed è quasi privo di cellule antitumorali pro-infiammatorie, quali i linfociti T e le cellule *natural killer*: per questo motivo viene infatti definito un tumore immunologicamente “freddo”(Tassone E. et al., 2020).

In particolare, alcuni dati preclinici e clinici indicano che gli OV possono trasformare tumori immunologicamente "freddi" in tumori "caldi" potenziando l'infiltrazione dei linfociti e quindi migliorando l'efficacia degli inibitori del *checkpoint* immunitario (ICI) (Reale A. et al., 2021).

Le proprietà immunostimolanti possedute dai virus oncolitici offrono quindi un'opportunità senza precedenti per modulare e contrastare il microambiente tumorale (TME) immunosoppressivo dell'adenocarcinoma duttale, stimolando il reclutamento di cellule del sistema immunitario nel sito del tumore al fine di migliorare l'efficacia terapeutica contro la malattia (Tassone E. et al., 2020).

Il genoma dei virus oncolitici può, inoltre, essere geneticamente modificato, consentendo l'inserimento di transgeni immunomodulatori ("virus oncolitici armati"), quali citochine immunostimolanti come l'IL-12 ed il fattore stimolante le colonie di granulociti e macrofagi (GM-CSF). Tale armamento immunologico può mirare a diminuire la soppressione immunitaria nel TME ed aumentare l'attivazione del sistema immunitario (Timmer F.E.F. et al., 2021).

In questo lavoro di tesi è stato utilizzato il virus oncolitico oHSV1-EGFP, basato sul virus dell'Herpes Simplex di tipo 1, il cui impiego come vettore oncolitico è particolarmente vantaggioso per una serie di caratteristiche da esso possedute. Trattasi infatti di un virus a DNA con un grande genoma, contenente diversi elementi ridondanti e geni non necessari per l'infezione che permettono di ingegnerizzare il genoma virale con l'inserimento di cassette geniche terapeutiche di grandi dimensioni o multiple, utilizzando tecniche di clonazione molecolare. Inoltre la sua replicazione può essere controllata con farmaci specifici per l'herpesvirus come l'Acyclovir (Scanlan H. et al., 2022).

Il virus oncolitico oHSV1-EGFP oggetto di studio di questo lavoro di tesi presenta lo stesso *backbone* del virus T-Vec, un HSV-1 oncolitico approvato da parte della *Food and Drug Administration* (FDA) e dalla Commissione Europea per la viroterapia oncolitica. T-VEC presenta le delezioni nei geni  $\gamma$  34.5, che rendono la replicazione del virus selettiva per le cellule tumorali e la delezione del gene che codifica la proteina IC47, coinvolta nei processi di immunoevasione condotti da HSV-1. Inoltre, è presente il gene GM-CSF (*granulocyte-macrophage colony stimulating factor*) inserito nei loci  $\gamma$  34.5 deleti, codificante una citochina che potenzia la risposta immunitaria contro le cellule tumorali. La delezione del gene ICP34.5, che codifica per il fattore di neurovirulenza, impedisce la replicazione del virus nei neuroni senza influenzarne la replicazione in altre cellule, in particolare le cellule tumorali. ICP34.5 è essenziale, infatti, per bloccare il *pathway* della proteina chinasi attivata da RNA (PKR). Molte cellule tumorali sono deficienti del *pathway* PKR, rendendo le delezioni di ICP34.5 più selettive per le cellule tumorali (Mondal M. et al., 2020).

T-VEC è stato, inoltre, ulteriormente progettato per migliorare la presentazione antigenica e l'attivazione dei linfociti T eliminando il gene che codifica la proteina

ICP47, che normalmente riduce la distruzione immunitaria delle cellule infette da HSV-1 codificando per l'inibitore del trasportatore associato alla presenza dell'antigene in modo da prevenire il legame dell'antigene al complesso maggiore di istocompatibilità di classe I (MHC-I). Questa delezione migliora quindi l'espressione dell'MHC-I sulla superficie cellulare, la presentazione antigenica e la sicurezza, compromettendo la capacità del virus di eludere il riconoscimento immunitario nelle cellule ospiti (Conry R.M. et al., 2018).

Per quanto concerne l'applicazione del vettore oncolitico oHSV-1 in questione nei confronti dell'adenocarcinoma duttale, un primo studio clinico di fase I che ha valutato la sicurezza dell'iniezione intratumorale di T-VEC in pazienti con PDAC avanzato ha dimostrato la sua fattibilità e tollerabilità; è attualmente in corso un secondo studio con T-VEC con l'obiettivo di determinare le dosi ottimali del virus e la sua efficacia sul contenimento del tumore in ulteriori pazienti PDAC non resecabili (Tassone E. et al., 2020).

Il virus oncolitico oHSV-1 EGFP utilizzato in questo lavoro sperimentale, a differenza di T-VEC, non presenta il gene GM-CSF (*granulocyte-macrophage colony stimulating factor*), ma nella regione intergenica UL55-UL56 è stato inserito il transgene codificante la proteina *Enhanced Green Fluorescent Protein* (EGFP), sotto il controllo del promotore CMV (*Immediate Early Cytomegalovirus*). Grazie alla presenza di questa proteina fluorescente è stato possibile monitorare la replicazione del virus tramite l'utilizzo del microscopio a fluorescenza.

Questo lavoro sperimentale si è principalmente focalizzato sulla valutazione della capacità del virus oHSV1-EGFP di replicarsi e di uccidere due linee di adenocarcinoma pancreatico duttale: la linea cellulare HPAF e la linea cellulare BxPC3. La prima linea cellulare deriva dal liquido ascitico peritoneale di un paziente caucasico di 44 anni, affetto da adenocarcinoma pancreatico duttale primario, con metastasi al fegato, diaframma e linfonodi, mentre la seconda linea cellulare è stata isolata dal tessuto pancreatico di una paziente di 61 anni, con adenocarcinoma duttale pancreatico primario, senza alcuna evidenza di metastasi. Queste due linee cellulari presentano alterazioni genetiche diverse nei confronti dei quattro geni più frequentemente mutati nell'adenocarcinoma duttale del pancreas: KRAS, TP53, CDKN2A e SMAD4. In particolare, la linea cellulare BxPC3 è caratterizzata da una mutazione missenso del gene TP53, dalla delezione omozigote di SMAD4, e dai geni KRAS e CDKN2A *wild type*. La linea cellulare HPAF, invece, presenta una mutazione a livello della seconda base del dodicesimo codone del gene KRAS, una mutazione missenso di TP53, una delezione *in frame* del gene CDKN2A e solamente il gene SMAD4 *wild type*.

La conoscenza approfondita dei meccanismi cellulari e molecolari specifici dello sviluppo e della progressione del tumore al pancreas risulta fondamentale per identificare strategie di diagnosi precoce, misure preventive ed interventi efficaci. La prognosi infausta dell'adenocarcinoma pancreatico è dovuta in parte alla mancanza di informazioni molecolari approfondite sullo sviluppo della malattia, perciò le linee cellulari utilizzate per studi *in vivo* ed *in vitro* su questa forma di cancro costituiscono uno strumento di indagine molto utile di questi eventi molecolari (Deer E. L. et al., 2010).

Entrambe le linee cellulari tumorali oggetto di studio sono risultate permissive nei confronti dell'infezione da parte del virus oncolitico oHSV1-EGFP, ma sono state riscontrate delle differenze fra le due linee cellulari: la linea cellulare BxPC3, come dimostrato dai grafici dei saggi di titolazione per placche (Figure 9 e 11 capitolo Risultati) infettata sia ad una molteplicità d'infezione (MOI) pari 0.1 PFU/cellula sia ad una MOI di 1 PFU/cellula, risulta più suscettibile all'infezione virale rispetto alla linea cellulare HPAF, che, infettata solamente ad una MOI pari a 1 PFU/cellula, risulta più resistente nei confronti dell'infezione da parte di questo virus oncolitico (Figura 13 capitolo Risultati). L'effetto citopatico dovuto all'azione virale è stato monitorato e confermato mediante l'utilizzo del microscopio a fluorescenza. Ulteriori esperimenti, quali saggi di vitalità cellulare ed esperimenti finalizzati ad individuare il tipo di morte cellulare indotta da questo virus oncolitico, potrebbero caratterizzare più approfonditamente la diversa suscettibilità all'infezione dimostrata da queste due linee cellulari di adenocarcinoma pancreatico.

Uno dei principali ostacoli riscontrati durante l'impiego dei virus oncolitici nei vari *trial* clinici riguarda la via di somministrazione utilizzata. Quella intratumorale è la più comunemente utilizzata, tuttavia la posizione anatomica del tumore, come nel caso dell'adenocarcinoma pancreatico, può imporre sfide tecniche per la somministrazione locale. Nonostante i siti non iniettati potrebbero beneficiare della risposta immunitaria sistemica, la risposta al trattamento potrebbe, tuttavia, non essere efficace, soprattutto per quanto riguarda metastasi distanti (Moaven O. et al., 2021).

La somministrazione endovenosa, d'altro canto, pur avendo una maggiore possibilità di raggiungere metastasi disseminate, presenta tuttavia diverse problematiche da risolvere ed indagare. Il sistema immunitario ha sviluppato infatti diversi meccanismi per prevenire la diffusione sistemica di microrganismi e non discrimina tra agenti patogeni e virus oncolitici terapeutici. La somministrazione endovenosa espone i virus oncolitici a fattori circolanti come gli anticorpi, che si legano e neutralizzano direttamente i virus o li contrassegnano per la successiva distruzione da parte del complemento e di varie cellule immunitarie. I virus sono anche neutralizzati dal legame non specifico alle proteine del siero ed alle cellule circolanti presenti nel flusso sanguigno. Anche organi come il polmone, la milza ed in particolare il fegato svolgono un ruolo significativo nell'eliminazione del virus dal flusso sanguigno poiché questi organi sono costituiti da tessuti che contengono macrofagi residenti, il cui ruolo è quello di ripulire il sangue da patogeni circolanti. Oltre alla neutralizzazione del virus nel flusso sanguigno, barriere fisiche come la matrice extracellulare del tumore possono comportare una minore somministrazione di virioni all'interno delle cellule tumorali (Roy and Bell, 2013). Per superare queste problematiche legate alla somministrazione sistemica dei virus oncolitici, sono in corso vari studi che stanno esplorando l'uso di cellule *carrier*, che possono essere infettate con il virus oncolitico *ex vivo* e poi essere somministrate per via sistemica, proteggendo il virus dalla neutralizzazione e dirigendolo specificamente verso il sito tumorale d'interesse.

Le migliori cellule *carrier* per la somministrazione dei virus oncolitici dovrebbero possedere tre caratteristiche essenziali: devono avere un tropismo nei confronti dei tumori, essere in grado di internalizzare il virus o consentire ai virioni di attaccarsi

stabilmente alla loro membrana cellulare e devono mantenere la vitalità per un tempo sufficiente al fine di consentire la distribuzione nel flusso sanguigno e la veicolazione del carico virale al sito od ai siti tumorali. Inoltre è oggetto di interessante dibattito l'impiego di cellule autologhe al fine di evitare qualsiasi problema di rigetto (Reale A. et al., 2021).

Tra le diverse cellule *carrier* candidate per oHSV-1, in questo lavoro di tesi è stato sperimentato l'utilizzo dei monociti. Quest'ultimi infatti vengono reclutati nel microambiente tumorale grazie al rilascio di citochine e chemochine, dove si differenziano in macrofagi associati al tumore (TAM) (Cui R. et al., 2016).

Considerando il ruolo vitale che i TAM svolgono nel sostenere la sopravvivenza delle cellule tumorali, sembra improbabile che i tumori possano diventare resistenti ad un trattamento veicolato dai monociti escludendo queste cellule dal microambiente tumorale (TME), come accade nel caso dei linfociti T (Reale A. et al., 2023).

Nella prospettiva di valutare, tramite studi *in vitro*, la capacità dei monociti di fungere da cellule *carrier* per trasportare l'OV nel sito tumorale, è stata analizzata la diversa suscettibilità dei monociti all'infezione del virus oHSV1-EGFP in condizioni sperimentali diverse, paragonando la replicazione virale in monociti coltivati in terreni condizionati dalla crescita delle cellule di adenocarcinoma pancreatico HPAF ed in monociti primari coltivati in terreno non condizionato. I dati che sono stati ottenuti, seppur limitati ad una sola linea cellulare di adenocarcinoma ed ancora preliminari, confermano i risultati precedentemente ottenuti in laboratorio utilizzando linee cellulari di glioblastoma e di carcinoma della mammella. Se i monociti vengono coltivati in terreni condizionati dalle cellule tumorali, vi è un aumento del titolo virale legato presumibilmente alla presenza di fattori di crescita tumorali, che andranno certamente individuati in maniera più approfondita con studi più dettagliati. I risultati ottenuti, seppur non del tutto completi, sembrano comunque confermare i monociti come una valida strategia per veicolare il virus oncolitico oHSV1-EGFP nei siti tumorali pancreatici. Altri esperimenti che potrebbero essere svolti in futuro, finalizzati a confermare e comprendere in maniera più completa i risultati ottenuti, potrebbero riguardare saggi di migrazione dei monociti per valutare in maniera più approfondita la loro capacità di migrare verso terreni condizionati dalle due linee di adenocarcinoma pancreatico oggetto di studio. Risulta infine di notevole importanza approfondire quali siano specificamente i fattori di crescita tumorali implicati nell'aumento del titolo virale nei monociti coltivati nei terreni condizionati dalle cellule tumorali di adenocarcinoma pancreatico in questione.



## 7. CONCLUSIONI

La viroterapia oncolitica si è rivelata una strategia terapeutica promettente, e non ancora completamente esplorata, per il trattamento dell'adenocarcinoma duttale del pancreas (PDAC). La stimolazione del sistema immunitario indotta dall'azione dei virus oncolitici (OV), infatti, offre un'opportunità per modulare e contrastare il microambiente tumorale particolarmente immunosoppressivo che caratterizza il PDAC. Sono in corso numerosi *trial* clinici per valutare l'efficacia di alcuni virus oncolitici, tra cui il T-VEC, nel trattamento di questa forma di cancro. In questo lavoro di tesi, in particolare, è stata valutata la capacità del virus oncolitico oHSV1-EGFP, basato sul virus dell'Herpes simplex di tipo 1, di replicarsi ed uccidere due linee cellulari di adenocarcinoma pancreatico (cellule BxPC3 e cellule HPAF). I risultati ottenuti hanno dimostrato che entrambe le linee cellulari sono permissive all'infezione virale, anche se la linea cellulare HPAF si è rilevata più resistente nei confronti dell'azione virale. Infine, con lo scopo di valutare *in vitro* la capacità dei monociti di fungere da cellule *carrier* per trasportare l'OV nel sito tumorale, i risultati ottenuti infettandoli in condizioni sperimentali diverse hanno confermato i dati ottenuti precedentemente in laboratorio: se coltivati in terreni condizionati dalle cellule tumorali, vi è un aumento del titolo virale legato presumibilmente alla presenza di fattori di crescita tumorali, che andranno certamente individuati in maniera più approfondita con studi più dettagliati. Questi dati ottenuti, seppur preliminari e non del tutto completi, possono comunque confermare i monociti come una valida strategia per veicolare il virus oncolitico oHSV1-EGFP nei siti tumorali pancreatici.





## 8. BIBLIOGRAFIA

Adamska, A.; Domenichini, A.; Falasca, M. Pancreatic Ductal Adenocarcinoma: Current and Evolving Therapies. *Int J Mol Sci.* 2017 Jun 22;18(7):1338. doi: 10.3390/ijms18071338. PMID: 28640192; PMCID: PMC5535831.

Anderson, E.M.; Thomassian, S.; Gong, J.; Hendifar, A.; Osipov, A. Advances in Pancreatic Ductal Adenocarcinoma Treatment. *Cancers (Basel).* 2021 Nov 3;13(21):5510. doi:10.3390/cancers13215510. PMID: 34771675; PMCID: PMC8583016.

Arduino, P.G.; Porter S.R. Herpes Simplex Virus Type I infection: overview on relevant clinico-pathological features. *J Oral Pathol Med.* 2008 Feb;37(2):107-21. doi: 10.1111/j.1600-0714.2007.00586.x. PMID: 18197856.

Barcellini, A.; Peloso, A.; Pugliese, L.; Vitolo, V.; Cobianchi, L. Locally Advanced Pancreatic Ductal Adenocarcinoma: Challenges and Progress. *Onco Targets Ther.* 2020 Dec 10;13:12705-12720. doi:10.2147/OTT.S220971. eCollection 2020. PMID: 33335406; PMCID: PMC7737010.

Bommareddy, P.K.; Kaufman, H.L. Unleashing the therapeutic potential of oncolytic viruses. *J Clin Invest.* 2018;128(4):1258–1260. doi: 10.1172/JCI120303. Epub 2018 Mar 5. PMID: 29504947; PMCID: PMC5873873.

Conry, R.M.; Westbrook, B.; McKee, S.; Norwood, T.G. Talimogene laherparepvec: First in class oncolytic virotherapy. *Hum Vaccin Immunother.* 2018 Apr 3;14(4):839-846. doi: 10.1080/21645515.2017.1412896. Epub 2018 Feb 22. PMID: 29420123; PMCID: PMC5893211.

Cui, R.; Yue, W.; Lattime, E.C.; Stein, M.N.; Xu, Q.; Tan, X-L. Targeting tumor-associated macrophages to combat pancreatic cancer. *Oncotarget.* 2016 Aug 2;7(31):50735-50754. doi:10.18632/oncotarget.9383. PMID: 27191744; PMCID: PMC5226617.

Deer, E.L.; González-Hernández, J.; Coursen, J.D.; Shea, J.E.; Ngatia, J.; Scaife, C.L.; Firpo, M.A.; Mulvihill, S.J. Phenotype and genotype of pancreatic cancer cell. *Pancreas.* 2010 May; 39(4): 425–435. doi:10.1097/MPA.0b013e3181c15963. PMID: 20418756; PMCID: PMC2860631.

Denes, C.E.; Everett, R.D.; Diefenbach, R.J. Tour de Herpes: Cycling Through the Life and Biology of HSV-1. *Methods Mol Biol.* 2020;2060:1-30. doi: 10.1007/978-1-4939-9814-2\_1. PMID: 31617170.

Elbadawy, H.M.; Gailledrat, M.; Desseaux, C.; Ponzin, D.; Ferrari, S. Targeting Herpetic Keratitis by Gene Therapy. *J Ophthalmol* 2012;2012:594869. doi:10.1155/2012/594869. Epub 2012 Dec 26. PMID: 23326647; PMCID: PMC3541562.

Fan, J.Q.; Wang, M.F.; Chen, H.L.; Shang, D.; Das, J.K.; Song, J. Current advances and outlooks in immunotherapy for pancreatic ductal adenocarcinoma. *Mol Cancer*. 2020 Feb 15;19(1):32. doi: 10.1186/s12943-020-01151-3. PMID: 32061257; PMCID: PMC7023714.

Fukuhara, H.; Ino, Y.; Todo, T. Oncolytic virus therapy: A new era of cancer treatment at dawn. *Cancer Sci*. 2016 Oct;107(10):1373-1379. doi: 10.1111/cas.13027. Epub 2016 Sep 9. PMID: 27486853; PMCID: PMC5084676.

Ghasemi Darestani, N.; Gilmanova, A.I.; Al-Gazally, M.E.; Zekiy, A.O.; Ansari, M.J.; Zabibah, R.S.; Jawad, M.A.; Al-Shalah, S.A.J.; Rizaev, J.A.; Alnassar, Y.S.; Mohammed, N.M.; Mustafa, Y.F.; Darvishi, M.; Akhavan-Sigari, R. Mesenchymal stem cell-released oncolytic virus: an innovative strategy for cancer treatment. *Cell Commun Signal*. 2023 Feb 24;21(1):43. doi: 10.1186/s12964-022-01012-0. PMID: 36829187; PMCID: PMC9960453.

Goradel, N.H.; Baker, A.T.; Arashkia, A.; Ebrahimi, N.; Ghorghanlu, S.; Negahdari, B. Oncolytic virotherapy: Challenges and Solutions. *Curr Probl Cancer*. 2021 Feb;45(1):100639. doi: 10.1016/j.currproblcancer.2020.100639. Epub 2020 Aug 15. PMID: 32828575.

Harrington, K.; Freeman, D.J.; Kelly, B.; Harper, J.; Soria, J.C. Optimizing oncolytic virotherapy in cancer treatment. *Nat Rev Drug Discov*. 2019 Sep;18(9):689-706. doi: 10.1038/s41573-019-0029-0. Epub 2019 Jul 10. PMID: 31292532.

Hezel, A.F.; Kimmelman, A.C.; Stanger, B.Z.; Bardeesy, N.; DePinho, R.A. Genetics and biology of pancreatic ductal adenocarcinoma. *Genes Dev*. 2006 May 15;20(10):1218-49. doi: 10.1101/gad.1415606. PMID: 16702400.

Jin, F.; Ma, K.; Chen, M.; Zou, M.; Wu, Y.; Li, F.; Wang, Y. Pentagalloylglucose Blocks the Nuclear Transport and the Process of Nucleocapsid Egress to Inhibit HSV-1 Infection. *Jpn J Infect Dis*. 2016;69(2):135-42. doi: 10.7883/yoken.JJID.2015.137. Epub 2015 Jul 10. PMID: 26166506.

LaRocca, C.J.; Warner, S.G. A New Role for Vitamin D: The Enhancement of Oncolytic Viral Therapy in Pancreatic Cancer. *Biomedicines*. 2018 Nov 5;6(4):104. doi: 10.3390/biomedicines6040104. PMID: 30400571; PMCID: PMC6316500.

Lemos de Matos, A.; Franco, L.S.; McFadden, G. Oncolytic Viruses and the Immune System: The Dynamic Duo. *Mol Ther Methods Clin Dev*. 2020 Jan 15;17:349-358. doi: 10.1016/j.omtm.2020.01.001. eCollection 2020 Jun 12. PMID: 32071927; PMCID: PMC7015832.

Liashkovich, I.; Hafezi, W.; Kühn, J.M.; Oberleithner, H.; Shahin, V. Nuclear delivery mechanism of herpes simplex virus type 1 genome. *J Mol Recognit*. 2011 May-Jun;24(3):414-21. doi: 10.1002/jmr.1120. PMID: 21504018.

Moaven, O.; Mangieri, C.W.; Stauffer, J.A.; Anastasiadis, P.Z.; Borad, M.J. Evolving Role of Oncolytic Virotherapy: Challenges and Prospects in Clinical Practic. *JCO Precis Oncol*. 2021 Feb 24;5:PO.20.00395. eCollection 2021. doi: 10.1200/PO.20.00395. PMID: 34250386; PMCID: PMC8232075.

Mondal, M.; Guo, J.; He, P.; Zhou, D. Recent advances of oncolytic virus in cancer therapy. *Hum Vaccin Immunother*. 2020 Oct 2;16(10):2389-2402. doi: 10.1080/21645515.2020.1723363. Epub 2020 Feb 20. PMID: 32078405; PMCID: PMC7644205.

Moreno R. Mesenchymal stem cells and oncolytic viruses: joining forces against cancer. *Journal for ImmunoTherapy of Cancer* 2021. doi: 10.1136/jitc-2020-001684. PMID: 33558278; PMCID: PMC7871674.

Muthana, M.; Rodrigues, S.; Chen, Y-Y.; Welford, A.; Hughes, R.; Tazzyman, S.; Essand, M.; Morrow, F.; Lewis, C.E. Macrophage Delivery of an Oncolytic Virus Abolishes Tumor Regrowth and Metastasis after Chemotherapy or Irradiation. *Cancer Res*. 2013 Jan 15;73(2):490-5. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-12-3056. Epub 2012 Nov 20. PMID: 23172310.

Nicoll, M.P.; Proença, J.T.; Efstathiou, S. The molecular basis of herpes simplex virus latency. *FEMS Microbiol Rev*. 2012 May;36(3):684-705. doi: 10.1111/j.1574-6976.2011.00320.x. Epub 2012 Jan 10. PMID: 22150699; PMCID: PMC3492847.

Park, W.; Chawla, A.; O' Reilly E.M. Pancreatic Cancer: A Review. *JAMA*. 2021 Sep 7;326(9):851-862. doi: 10.1001/jama.2021.13027. PMID: 34547082; PMCID: PMC9363152.

Parrasia, S.; Zoratti, M.; Szabò, I.; Biasutto, L. Targeting Pancreatic ductal Adenocarcinoma (PDAC). *Cell Physiol Biochem*. 2021 Jan 29;55(1):61-90. doi: 10.33594/000000326. PMID: 33508184.

Pelosi, E.; Castelli, G.; Testa, U. Pancreatic Cancer: Molecular Characterization, Clonal Evolution and Cancer Stem Cells. *Biomedicines*. 2017 Nov 18;5(4):65. doi: 10.3390/biomedicines5040065. PMID: 29156578; PMCID: PMC5744089.

Reale, A.; Calistri, A.; Altomonte, J. Giving Oncolytic Viruses a Free Ride: Carrier Cells for Oncolytic Virotherapy. *Pharmaceutics*. 2021 Dec 18;13(12):2192. doi: 10.3390/pharmaceutics13122192. PMID: 34959474; PMCID: PMC8709025.

Reale, A.; Krutzke, L.; Cadamuro, M.; Vitiello, A.; von Einem, J.; Kochanek, S.; Palù, G.; Parolin, C.; Calistri, A. Human Monocytes Are Suitable Carriers for the Delivery of Oncolytic Herpes Simplex Virus Type 1 In Vitro and in a

Chicken Embryo Chorioallantoic Membrane Model of Cancer. *Int. J. Mol. Sci.* 2023, 24, 9255. <https://doi.org/10.3390/ijms24119255>.

Rice, S.A. Release of HSV-1 Cell-Free Virions: Mechanisms, Regulation, and Likely Role in Human-Human Transmission. *Viruses*. 2021 Nov 30;13(12):2395. doi: 10.3390/v13122395. PMID: 34960664. PMCID: PMC8704881.

Roy, D.G.; Bell, J.C. Cell carriers for oncolytic viruses: current challenges and future directions. *Oncolytic Virother.* 2013 Oct 9;2:47-56. doi: 10.2147/OV.S36623. eCollection 2013. PMID: 27512657; PMCID: PMC4918354.

Saleh, D.; Yarrarapu, S.N.S.; Sharma, S. Herpes Simplex Type 1. StatPearls Publishing; 2023 Jan.2022 Aug 29. PMID: 29489260.

Scanlan H, Coffman Z, Bettencourt J, Shipley T and Bramblett DE (2022). Herpes simplex virus 1 as an oncolytic viral therapy for refractory cancers. *Front. Oncol.* 12:940019. doi: 10.3389/fonc.2022.940019.

Shi T, Song X, Wang Y, Liu F and Wei J (2020) Combining Oncolytic Viruses With Cancer Immunotherapy: Establishing a New Generation of Cancer Treatment. *Front. Immunol.* 11:683. doi:10.3389/fimmu.2020.00683.

Sun, H.; Zhang, B.; Li, H. The Roles of Frequently Mutated Genes of Pancreatic Cancer in Regulation of Tumor Microenvironment. *Technol Cancer Res Treat.* 2020 Jan-Dec;19:1533033820920969. doi: 10.1177/1533033820920969. PMID: 32372692; PMCID: PMC7225789.

Tassone, E.; Muscolini, M.; van Montfoort, N.; Hiscott, J. Oncolytic virotherapy for pancreatic ductal adenocarcinoma: A glimmer of hope after years of disappointment? *Cytokine Growth Factor Rev.* 2020 Dec;56:141-148. doi: 10.1016/j.cytogfr.2020.07.015. Epub 2020 Aug 8. PMID: 32859494.

Timmer, F.E.F.; Geboers, B.; Nieuwenhuizen, S.; Dijkstra, M.; Schouten E.A.C.; Puijk R.S.; de Vries J.J.J., van den Tol, M.P.; Bruynzeel, A.M.E.; Streppel, M.M.; Wilink, J.W.; van der Vliet, H.J.; Meijerink, M.R.; Scheffer, H.J.; de Gruijl, T.D. Pancreatic Cancer and Immunotherapy: A Clinical Overview. *Cancers (Basel)*. 2021 Aug 17;13(16):4138. doi: 10.3390/cancers13164138. PMID: 34439292; PMCID: PMC8393975.

Wu, J.; Cai, J. Dilemma and Challenge of Immunotherapy for Pancreatic Cancer. *Dig Dis Sci.* 2021 Feb;66(2):359-368. doi: 10.1007/s10620-020-06183-9. Epub 2020 Mar 5. PMID: 32140943.

Ylösmäki, E.; Cerullo, V. Design and application of oncolytic viruses for cancer immunotherapy. *Curr Opin Biotechnol.* 2020 Oct;65:25-36. Epub 2019 Dec 23. doi: 10.1016/j.copbio.2019.11.016. PMID: 31874424.