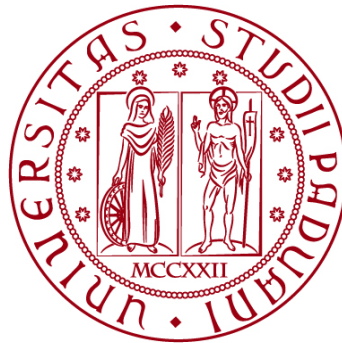


UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI PADOVA

DIPARTIMENTO DI BIOLOGIA

Corso di Laurea in Biologia Molecolare



ELABORATO DI LAUREA

**HSV1716 PREVIENE IN VITRO LA RICRESCITA DI
CELLULE DI MIELOMA QUANDO ASSOCIATO A
BORTEZOMIB, E RIDUCE SIGNIFICATIVAMENTE
LA CRESCITA DI TUMORI SISTEMICI IN MODELLI
MURINI.**

Tutor: Prof.ssa Arianna Calistri
Dipartimento di Medicina Molecolare

Laureanda: Margherita Piccolo

ANNO ACCADEMICO 2022/2023

INDICE

1. ABSTRACT	5
2. STATO DELL'ARTE	
2.1 Virus oncolitici	7
2.2 Mieloma Multiplo	8
2.3 HSV1716	10
2.4 Bortezomib	10
3. APPROCCIO SPERIMENTALE	
3.1 Cellule	12
3.2 Ceppi virali e infezione delle cellule target	13
3.3 Analisi STR	13
3.4 Citometria a flusso	14
3.5 Colorazioni	14
3.6 PCR quantitativa	16
4. RISULTATI	
4.1 HSV1716 induce morte cellulare in linee cellulari di mieloma umano e campioni primari di pazienti.	17
4.2 HSV1716 induce morte cellulare attraverso apoptosi	18
4.3 Terapia a virus oncolitici riduce il carico tumorale in modelli murini di mieloma	19
5. DISCUSSIONE	21
BIBLIOGRAFIA	22
APPENDICE	24

1. ABSTRACT

Il mieloma multiplo rimane ampiamente incurabile per la sua capacità di acquisire resistenza a terapie antitumorali; è quindi fondamentale trovare nuove strategie terapeutiche sicure e tollerabili dall'organismo. Gli autori analizzano le potenzialità del virus herpes simplex HSV1716 (SEPREHVIR®), in grado di replicare preferibilmente in cellule trasformate. Linee cellulari di mieloma e cellule primarie ottenute da pazienti sono state infettate con HSV1716 per valutare il livello di morte cellulare con colorazione a ioduro di propidio (PI) e Annessina V, e tramite marcatori di apoptosi e autofagia sfruttando PCR quantitativa in Real Time. La morte cellulare è associata alla positività a PI e Annessina V, e all'elevata espressione di geni apoptotici. E' stato osservato che terapie basate sulla combinazione di HSV1716 e Bortezomib prevengono la ricrescita di cellule di mieloma fino a 25 giorni dall'inizio del trattamento; a differenza invece di terapie unicamente a base di Bortezomib. L'efficacia virale è stata testata in modelli murini con xenotrapianto o singenici di mieloma. Dopo 6 o 7 giorni, i topi malati sono stati trattati per via endovenosa con HSV1716 o con soluzione fisiologica, utilizzata come controllo. Entrambi i modelli murini trattati con HSV1716 hanno presentato una crescita della massa tumorale significativamente ridotta rispetto ai controlli. In conclusione, HSV1716 ha potenti effetti antitumorali e potrebbe rappresentare una nuova terapia contro il mieloma multiplo.

2. STATO DELL'ARTE

2.1 VIRUS ONCOLITICI

I Virus Oncolitici (OV) sono una promettente classe emergente di immunoterapie antitumorali. Sfruttano l'abilità innata, o indotta mediante manipolazione genica, di alcuni virus replicazione-competenti di infettare e lisare selettivamente cellule neoplastiche, lasciando intatte quelle sane (**Figura 1**). Presentano un tollerabile profilo di sicurezza che non è presente in altre terapie contro le neoplasie maligne. I Virus Oncolitici possono essere selezionati sulla base della loro abilità innata di indurre morte cellulare immunogenica (ICD) in cellule tumorali; oppure possono essere geneticamente modificati per attivare selettività tumorale, promuovere competenza replicativa, limitare la patogenicità e aumentare l'immunità. Virus ingegnerizzati possono essere manipolati tramite delezione e modificazione di geni virali o, in virus con grandi genomi, possono essere inseriti transgeni eucariotici con lo scopo di aumentare l'immunità antitumorale.

Sono presenti sia virus con genoma a DNA che a RNA dotati di attività oncolitica in cellule di mammifero; anche se in trial clinici sono stati utilizzati soprattutto i primi perché più studiati. Inoltre, i genomi di virus a DNA sono solitamente più grandi e hanno il vantaggio aggiuntivo di facilitare l'espressione di geni ricombinanti.

L'unico virus oncolitico ad essere stato approvato e inserito in clinica è Tamlimogene laherparepvec (T-VEC), un virus dell'Herpes Simplex di tipo 1 (HSV1) ingegnerizzato per replicare preferenzialmente in cellule tumorali e indurre risposte immunitarie antitumorali. Iniezioni intratumorali di T-VEC sono state analizzate in trial clinici con pazienti con melanoma accessibile e non resecabile; portando successivamente all'approvazione da parte della Food and Drug Administration (FDA) nel 2015 e dell'Agenzia Europea del Farmaco (EMA) nel 2016. (Shalhout et al., 2023)

Nonostante il successo di T-VEC, i trattamenti con virus oncolitici in tumori diversi dal melanoma, hanno dato limitati risultati clinici. Ci sono ancora moltissimi aspetti sull'utilizzo di questi virus che non sono del tutto chiari o conosciuti. Per ora infatti, la maggior parte della ricerca si focalizza sul trovare virus con un elevato profilo di sicurezza; studiare modalità per inserire il virus senza che questo venga eliminato dal sistema immunitario prima di raggiungere l'ambiente tumorale; capire quali sono i modelli in vitro migliori da utilizzare e come modificare geneticamente i virus in modo da sfruttare al massimo le loro potenzialità.

Recenti studi si sono focalizzati su virus oncolitici basati su HSV1: è stato mostrato come questi possano infettare cellule di mieloma, indurre apoptosi, indurre oncolisi in linee cellulari e in campioni di pazienti, e ridurre tasso tumorale in modelli di xenotrapianto di mieloma sottocutaneo. (Reale et al., 2019). Nell'articolo che analizzerò, gli autori osservano l'azione di un HSV di tipo 1 modificato: HSV1716,

contro cellule di mieloma per capire le potenzialità del virus nel trattamento di questo tumore ematologico.

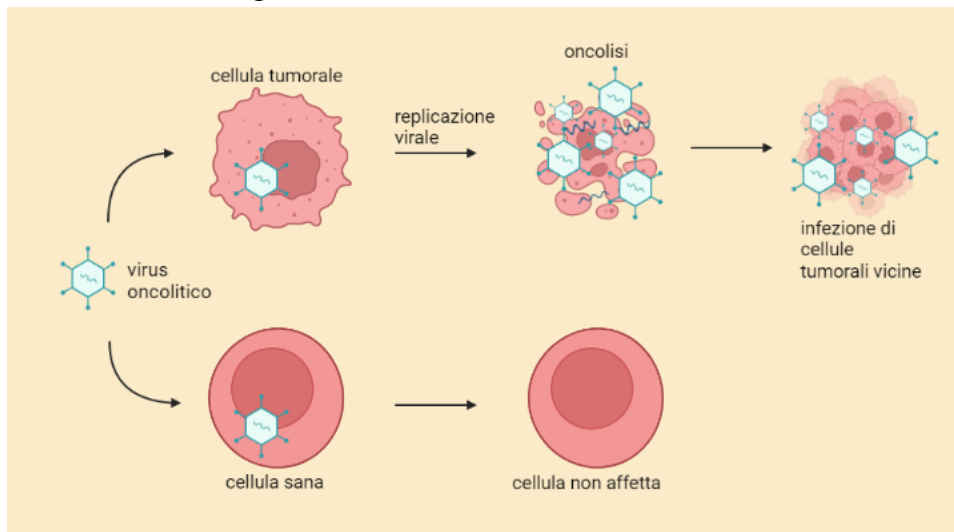


Figura 1. Rappresentazione schematica della selettiva replicazione di virus oncolitici.

2.2 MIELOMA MULTIPLO

Il mieloma multiplo è un tumore ematico maligno caratterizzato dall'espansione clonale, nel midollo osseo, di linfociti B differenziati, conosciuti come plasmacellule. Viene definito multiplo perché coinvolge contemporaneamente diverse aree del corpo, quali ad esempio colonna vertebrale, bacino e coste.

Il mieloma non forma una massa tumorale solida, ma si osserva l'aumento del numero di plasmacellule aberranti nel midollo osseo, che proliferando senza controllo, producono in grande quantità una forma di anticorpo non funzionante, detta Paraproteina, circolante nell'organismo e incapace di proteggere dalle infezioni.

Le cellule di mieloma interferiscono con la corretta produzione di cellule del sangue riducendola drasticamente, questo può provocare:

- Anemia per basso livello di eritrociti nel sangue;
- Frequenti emorragie lievi: bassi quantitativi di piastrine nel sangue non sono in grado di controllare correttamente la coagulazione del sangue;
- Vulnerabilità ad infezioni: il sistema immunitario si indebolisce poiché non vengono prodotti anticorpi funzionanti;
- Aumento della viscosità dovuto ad un'eccessiva espressione di paraproteine da parte delle cellule tumorali.

Ulteriori sintomi possono essere:

- Danno osseo, poiché la presenza di cellule di mieloma accelera l'attività degli osteoclasti, portando alla degradazione del tessuto osseo. Poiché gli osteoblasti non riescono a generare il nuovo tessuto osseo, aumenta la probabilità di fratture;

- Ipercalcemia, dovuta ad un aumento del rilascio di calcio nel sangue a seguito della degradazione del tessuto osseo.

Una rappresentazione schematica della patogenesi e dei sintomi del mieloma è riportata in **Figura 2**.

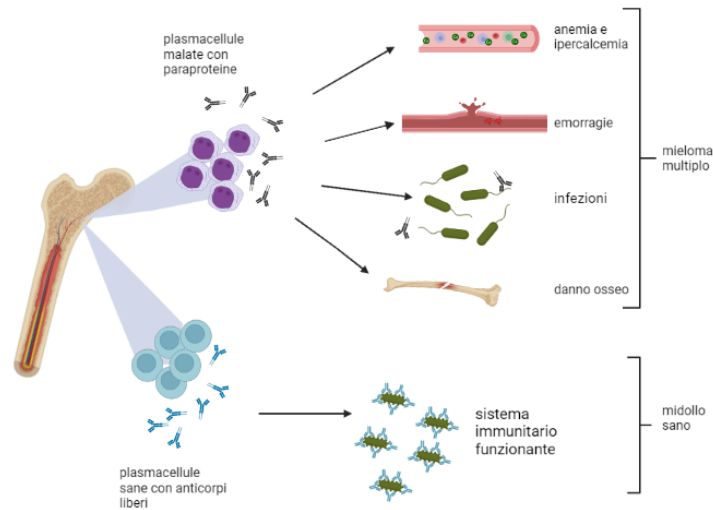


Figura 2. Raffigurazione delle conseguenze sintomatiche di mieloma multiplo a confronto con la condizione fisiologica nel midollo sano.

Non si è a conoscenza di una vera e propria causa che porta alla formazione di questo tipo di tumore; tuttavia si pensa possa esistere un collegamento con la Gammopatia Monoclonale di Incerto Significato (MGUS), che porta ad un eccesso di immunoglobuline anomale nel sangue. Nonostante il sostanziale aumento del tasso di sopravvivenza grazie all'introduzione di agenti anti mieloma più efficaci, la malattia solitamente ha delle recidive e diventa resistente ai trattamenti, portando a morte precoce il paziente.

Per questo sono necessarie strategie per eliminare definitivamente il mieloma e prevenire recidive dopo la chemioterapia.

Le terapie attuali tendono a mantenere sotto controllo il mieloma per alcuni anni, ma nella maggior parte dei casi non si è in grado di curarlo.

I trattamenti più utilizzati sono:

- Chemioterapia che utilizza farmaci che riducono le cellule tumorali, danneggiando però anche quelle sane;
- Steroidi usati in supporto alla chemioterapia;
- Talidomide, Lenalidomide e Pomalidomide, in supporto alla chemioterapia, però teratogeni e potenzialmente ipercoagulanti;
- Trapianto di cellule staminali per permettere la ricrescita di cellule di midollo osseo, danneggiato sia dalla malattia che dalle terapie; Bortezomib. (da: The American Cancer Society., 2018)

2.3 HSV1716

HSV1716 è un HSV1 modificato originato dal ceppo wild-type 17. Presenta delezioni in entrambe le copie del gene RL1, codificante per il fattore di virulenza ICP34.5. (Mondal et al., 2020). ICP34.5 si lega alla proteina fosfatasi 1 α cellulare attivando la sintesi proteica, e all'antigene nucleare di proliferazione cellulare PCNA, che assume funzione replicativa (He et al., 1997); senza ICP34.5, HSV1716 non è in grado di replicare. Questo però non avviene nell'ambiente tumorale: PCNA è infatti attivato anche in assenza di ICP34.5, permettendo a HSV1716 di replicare all'interno delle cellule tumorali. Si pensa che in alcuni tipi cellulari l'assenza di ICP34.5 sia compensata da una proteina omologa, la cui sintesi è indotta dall'infezione di HSV all'interno della cellula. Questa proteina lega PCNA al posto di ICP34.5, permettendo al virus di replicare. (Brown et al., 1997)

In aggiunta, oncogeni come RAS e MEK, presenti in alcune cellule tumorali, inibiscono il pathway della proteina chinasi attivata dall'RNA (PKR), impedendo il blocco della sintesi proteica indotto dall'infezione virale. Come suggerisce il nome, PKR è attivata da RNA a doppio filamento. Poiché la maggior parte dei virus sintetizzano dsRNA durante la loro replicazione o formano strutture a dsRNA, codificano per geni in grado di inibire l'attivazione della PKR. (He et al., 1997)

Modelli in fase preclinica con HSV1716 utilizzato per il trattamento di gliomi, mostrano un tasso tumorale ridotto e una persistenza virale elevata; con replicazione virale osservata solamente in tessuti tumorali. Simili risultati sono stati osservati nel melanoma.

Nell'articolo gli autori dimostrano, usando analisi in vitro, che:

- HSV1716 è efficace nell'indurre oncolisi sia in vitro in linee cellulari di mieloma, sia ex vivo in cellule di mieloma ottenute da pazienti primari;
- Quando HSV1716 è associato a bortezomib previene la ricrescita di cellule di mieloma;
- HSV1716 riduce significativamente il tasso tumorale in xenotrapianti sistemici e modelli murini singenici di mieloma

2.4 BORTEZOMIB

Conosciuto anche come VELCADE, è un farmaco che agisce in modo più selettivo rispetto alla chemioterapia. Legando la subunità del proteasoma 26S, inibisce reversibilmente il proteasoma bloccandone la funzione. (Sharma et al., 2022) Il proteasoma occupa un ruolo essenziale per l'omeostasi delle cellule; è coinvolto nella degradazione ubiquitino-mediata di proteine danneggiate o estranee. Agisce in numerosi processi cellulari tra cui turnover, controllo qualità delle proteine, ciclo cellulare e apoptosi, trascrizione e vie di segnale cellulare, risposta immunitaria, presentazione antigenica, infiammazione e sviluppo. Inibendo il proteasoma si provoca un aumento delle proteine danneggiate e estranee all'interno della cellula; questo attiva il meccanismo di morte cellulare programmata. (Einsele H., 2010)

Bortezomib è molto efficace contro le cellule di mieloma che sono fortemente dipendenti dall'azione del proteasoma. Infatti per proliferare, le cellule tumorali necessitano dell'inibizione di pathways proapoptotici.

Le cellule di mieloma sono più sensibili al trattamento poiché producono molte più proteine rispetto alle cellule sane. Si dice quindi che il trattamento con Bortezomib è selettivo nei confronti delle cellule di mieloma. (Sharma et al., 2022)

3. APPROCCIO SPERIMENTALE

3.1 CELLULE

Di seguito sono elencate le diverse linee cellulari che vengono usate negli esperimenti presentati nell'articolo

- *JJN-3*: linea di cellule che sono state ricavate dal midollo osseo di una donna di 57 anni con leucemia delle plasmacellule (IgA1kappa) in una diagnosi del 1987; questa linea cellulare è un subclone della linea parentale JJN-1. Hanno una morfologia tondeggianti e crescono in sospensione sia come cellule singole sia come cellule multinucleate. Sono state usate per verificare la capacità di infezione di HSV1716 delle cellule tumorali, per verificare il livello di oncolisi cellulare in seguito ad infezione con HSV1716, per osservare l'espressione di geni di HSV1716 in cellule tumorali, per valutare il livello di apoptosi in seguito a infezione con HSV1716, e per creare un modello di xenotrapianto in topi NSG.

- *OPM-2*: linea di cellule estratte da sangue periferico di una donna di 56 anni con mieloma multiplo (IgG lambda) in fase leucemica recidiva nel 1982. Sono cellule che crescono in sospensione a singola cellula, con forma tondeggianti o poligonale. Sono state usate per per osservare il livello di oncolisi cellulare in seguito ad infezione con HSV1716.

- *U266*: linea cellulare ricavata da sangue periferico di un uomo di 53 anni con mieloma secernente IgE recidivo nel 1968. Hanno morfologia tondeggianti o poligonale, crescono in sospensione a singola cellula o in gruppi. Sono state usate per verificare la capacità di infezione di HSV1716 delle cellule tumorali, per osservare il livello di oncolisi cellulare in seguito ad infezione con HSV1716.

- *RPMI8266*: linea cellulare di linfociti B isolate nel 1966 da sangue periferico di un uomo di 61 anni malato di plasmacitoma. La maggior parte delle cellule cresce singolarmente in sospensione, ma possono anche crescere in adesione. Sono state usate per per osservare il livello di oncolisi cellulare in seguito ad infezione con HSV1716.

- *5TGM11*: linea cellulare di mieloma multiplo sviluppatosi spontaneamente in topi C57BL/KaLwRij, ed è stata propagata con passaggi seriali in topi singenici per stabilizzare la linea cellulare. Sono state fatte crescere in sospensione. Sono state usate per verificare il livello di oncolisi cellulare in seguito ad infezione con HSV1716, e per creare un modello di topo singenico di mieloma in topi C57BL/6KaLwRij.

- *LINFOCITI PRIMARI*: queste cellule sono state usate per verificare il livello di oncolisi cellulare in seguito ad infezione con HSV1716. Sono state estratte da campioni di sangue di pazienti con tecnica di separazione Ficoll. Questa tecnica permette di suddividere un campione di sangue periferico nei suoi componenti e quindi isolare il tipo di leucocita interessato, in questo caso i linfociti primari.

- *CELLULE CD138- e CD138+*: sono cellule contenenti o meno la proteina CD138. Questa proteina è presente sulle plasmacellule nel midollo osseo e in alcune

cellule epiteliali, ed è utile per diagnosticare la presenza di neoplasie sulle plasmacellule. Queste cellule sono state usate per verificare il livello di oncolisi cellulare in seguito ad infezione con HSV1716. Sono state prelevate da estratti di midollo osseo ottenuti sia da pazienti con mieloma e con leucemia delle plasmacellule, e sia da individui sani. Sono state isolate con separazione magnetica (MACS) con microsfere CD138+. MACS è una tecnica di separazione comunemente usata per isolare diversi tipi di cellule in base alla loro differenziazione. Sfrutta anticorpi, enzimi, lectine o streptavidine legate a sfere magnetiche, che vengono successivamente associate a cellule target. Le cellule marcate con le sfere magnetiche sono posizionate all'interno di un campo magnetico che le polarizza. Le cellule così polarizzate sono poi estratte per eluzione, mentre quelle non polarizzate sono lavate via.

3.2 CEPPI VIRALI E INFEZIONE DELLE CELLULE TARGET

- HSV1716-GFP: è un HSV1716 modificato, a cui è stata aggiunta la proteina reporter Green Fluorescent Protein (GFP) all'interno del gene RL1 che è controllato dal promotore della fosfoglicerato chinasi. Se il virus replica, la GFP viene sintetizzata e esprime una fluorescenza verde. La fluorescenza è usata come indicatore di replicazione del virus all'interno delle cellule. Per valutare l'infezione di HSV1716-GFP le cellule sono state colorate con TO-PRO-3, colorante con fluorescenza rossa che è in grado di permeare solamente all'interno di cellule morte. GFP è stato osservato in cellule vitali TO-PRO-3 negative, usando citometria a flusso.

Di seguito sono riportate e discusse le principali tecniche e metodi utilizzati dagli Autori nell'articolo oggetto di questa tesi.

3.3 ANALISI STR

Dagli autori sono state utilizzate diverse linee cellulari di mieloma multiplo per poter effettuare diverse valutazioni sperimentali. Sono state usate le linee cellulari: JN-3, OPM-2, U266, RPMI-8226, 5TGM1; tutte quante mantenute in terreno RPMI. Per verificare la loro identità sono state fatte delle analisi Short Tandem Repeats (STR). Gli STR, detti anche microsatelliti, sono delle corte regioni altamente polimorfe ripetute (dalle 3 alle 80 ripetizioni) nel DNA. La loro presenza è dovuta ad uno scivolamento della polimerasi durante la replicazione, questo aumenta o diminuisce il numero di ripetizioni di una certa sequenza. Sono regioni sufficientemente brevi da poter essere amplificate per PCR anche in presenza di DNA parzialmente degradato. Poiché le sequenze fiancheggianti un determinato microsatellite sono conservate, conoscendo le sequenze è possibile sintetizzare primer per l'amplificazione selettiva di singoli loci STR. L'amplificazione darà origine a due bande se l'individuo è eterozigote, o ad un'unica banda se è omozigote. Associando un segnale fluorescente ad uno o entrambi i primer prima di eseguire la PCR, una volta ottenuto il prodotto di PCR e caricato in un sistema di elettroforesi capillare su gel di poliacrilammide, un rilevatore di fluorescenza è in grado di captare il segnale e restituirci i risultati.

Può essere ampliata l'analisi, amplificando nella stessa reazione più microsatelliti contemporaneamente tramite multiplex PCR, analizzando così più loci. Conoscendo gli STR delle diverse linee cellulari è possibile creare un profilo unico del DNA che può essere confrontato con le cellule di interesse, per accertarne l'identità.

3.4 CITOMETRIA A FLUSSO

Citometria a flusso è una tecnologia che si occupa di effettuare veloci analisi di singole cellule o particelle mentre scorrono sospese in soluzione salina attraverso laser singoli o multipli. Ogni particella è analizzata per capacità di disperdere la luce visibile, e per uno o più parametri di fluorescenza. La dispersione della luce visibile è misurata in due diverse direzioni: in avanti (forward scatter o FSC) che indica la dimensione relativa della cellula, e a 90 gradi (side scatter o SSC) che indica complessità o granulosità della cellula. La luce dispersa è indipendente dalla fluorescenza. I campioni sono preparati per misurare la fluorescenza attraverso la trasfezione e espressione di proteine fluorescenti (GFP), colorazione con coloranti fluorescenti (PI, DNA) o colorazione con anticorpi legati a fluorocromi (CD3 FITC). In base ai risultati ottenuti si possono comprendere caratteristiche della cellula osservata.

La citometria a flusso è uno strumento potente che ha applicazioni in immunologia, biologia molecolare, batteriologia, virologia, biologia del cancro e il monitoraggio di malattie infettive. Permette la caratterizzazione simultanea di diverse popolazioni di cellule che possono essere dissociate in cellule singole. Ha visto importanti miglioramenti durante gli ultimi 30 anni, permettendo la realizzazione di studi dettagliati sul sistema immunitario e altre aree di biologia cellulare.

La parte conclusiva di un esperimento con citometria a flusso è l'analisi dei dati. Si usa il tradizionale diagramma a due parametri oppure nuovi algoritmi per analisi di cluster di dati come PCA, SPADE e T-sne che permettono una più efficace ricerca sui dati per estrarre informazioni precise in modo immediato. (McKinnon KM., 2018)

Nell'articolo questa tecnica viene utilizzata per:

- Verificare l'infezione con HSV1716, con inserito all'interno del gene RL1 la proteina fluorescente GFP. Le cellule nelle quali è avvenuta correttamente l'infezione, emettono fluorescenza verde per la presenza della GFP.
- Valutare il tasso di tumorigenicità nel modello di xenotrapianto JJN-3 murino.
- Verificare l'oncolisi cellulare; la citometria a flusso è associata alla colorazione con PI.
- Verificare l'apoptosi cellulare; la citometria a flusso è associata alla colorazione con PI e annessina V.

3.5 COLORAZIONI

3.5.1 Con Ioduro di propidio

Lo ioduro di propidio (PI) è un noto colorante fluorescente rosso di contrasto cromosomico e nucleare. Poiché non è in grado di permeare in cellule vive, è

comunemente usato per riconoscere cellule morte all'interno di una popolazione, è infatti in grado di legare solo DNA a doppio filamento di cellule morte che presentano la membrana frammentata.

PI si lega al DNA intercalandosi tra le basi azotate con poca o nessuna preferenza di sequenze. In soluzione acquosa, il colorante ha un'eccitazione/emissione massima di 493/636 nm. Quando è legato al DNA si ha uno spostamento del livello di eccitazione/emissione verso massimi di 540/640 nm.

La colorazione con PI, associato a citometro a flusso, viene usata dagli autori per:

- Valutare la vitalità cellulare a seguito di trattamento con HSV1716 e Bortezomib.
- Valutare l'apoptosi cellulare

3.5.2 Con Annessina V

Coniugati fluorescenti di Annessina V sono comunemente utilizzati per identificare cellule apoptotiche. L'Annessina V è un'anticoagulante vascolare umano di 35-36 kDa ed è una proteina che lega fosfolipidi calcio dipendenti con elevata affinità per il fosfolipide anionico Fosfatidilserina (PS). In cellule sane, PS è localizzata sul lato citoplasmatico della membrana plasmatica. Tuttavia, durante l'apoptosi, la membrana plasmatica va incontro a cambiamenti strutturali che includono anche la traslocazione della PS dallo strato interno a quello esterno della membrana. Lo spostamento della PS marca la cellula per il riconoscimento e la fagocitosi da parte di macrofagi.

È solitamente associata alla citometria a flusso per valutare il tasso di apoptosi all'interno di una popolazione cellulare, come è stato fatto nell'articolo trattato.

3.5.3 Con Ematossilina e Eosina

Colorazione con ematossilina e eosina è stata e continua ad essere essenziale per il riconoscimento di diverse tipologie tissutali e i cambiamenti morfologici che formano la base delle attuali diagnosi sul cancro. La colorazione funziona molto bene con un gran numero di fissanti e mostra una grande varietà di caratteristiche citoplasmatiche, nucleari e della matrice extracellulare. L'ematossilina ha un colore blu-violetto e evidenzia gli acidi nucleici. Mentre l'eosina è rosa e colora proteine in maniera non specifica. In un tipico tessuto, i nuclei sono colorati di blu, mentre il nucleolo, il citoplasma e la membrana extracellulare presentano diverse gradazioni di rosa. Cellule correttamente fissate mostrano evidenti dettagli intranucleari: si riesce a distinguere il livello di condensazione dell'eterocromatina (colorato con ematossilina); vengono evidenziati i poliribosomi che si presentano di colore blu; si può identificare il golgi in una zona priva di colorazione vicina al nucleo. Dunque la colorazione permette di ottenere notevoli informazioni strutturali legate a specifiche implicazioni funzionali.

Un limite della colorazione a ematossilina è la sua incompatibilità con l'immunofluorescenza. Ematossilina, senza eosina, è utile come colorante di contrasto per molte procedure immunostochimiche o di ibridazione che usano substrati colorimetrici. (Fischer et al., 2008)

Nell'articolo questo tipo di colorazione viene usata per analizzare il tasso tumorale grazie all'osservazione della morfologia cellulare di sezioni di tibia del modello murino singenico 5TGM11.

3.6 PCR QUANTITATIVA

Retrotrascrivendo una molecola di RNA, il filamento di cDNA prodotto può essere utilizzato come stampo in una reazione di amplificazione. È possibile monitorare ciclo per ciclo la quantità di amplicone prodotto nella miscela di reazione osservando un cambiamento di fluorescenza legato alla produzione dell'amplicone stesso. Questa tecnica è detta real time pcr oppure quantitative pcr. La misura di fluorescenza avviene ciclo di PCR dopo ciclo e non alla fine del processo di amplificazione. Il punto chiave è che è possibile stabilire una correlazione tra il numero di cicli di amplificazione necessari affinché diventi rilevabile il prodotto di PCR (detto threshold cycle or CT) e la quantità di template presente all'inizio nel campione. In questo modo è possibile determinare la quantità assoluta di un certo template o il rapporto di quantità tra template differenti (quindi per esempio stabilire il livello di espressione di un certo trascritto in diversi campioni).

Esistono due metodi di real time PCR:

- Tramite l'utilizzo di una sostanza fluorescente (SYBR green) che quando si lega selettivamente al DNA a doppia elica diventa fluorescente. All'aumentare del DNA aumenta anche l'intensità della fluorescenza percepita dalla macchina.
- Tramite l'uso di sonde che recano dei reporter fluorescenti: si basa sul processo di fluorescence resonant energy transfer (FRET), e avviene quando uno dei due fluorofori in stretta prossimità (reporter) emette fluorescenza che può essere assorbita ed eccita un secondo fluoroforo (quencher). Solitamente vengono usate sonde Taqman: formate da due molecole, una con funzione di reporter e l'altra di quencher, quando le molecole sono in prossimità il quencher è in grado di assorbire la fluorescenza emessa dal reporter. Quando la sonda viene rotta dall'attività 5'-3' della Taq polimerasi, si annulla la prossimità delle due molecole permettendo l'emissione di fluorescenza che viene rilevata. Un aumento del prodotto determina aumento proporzionale della fluorescenza.

Negli esperimenti effettuati dagli autori vengono utilizzati entrambi i metodi per valutare i livelli di espressione di diversi geni apoptotici a seguito dell'infezione con HSV1716.

4. RISULTATI

I principali Risultati ottenuti nel lavoro oggetto di questa tesi possono essere così schematizzati:

4.1 HSV1716 INDUCE MORTE CELLULARE IN LINEE CELLULARI DI MIELOMA UMANO E CAMPIONI PRIMARI DI PAZIENTI.

Le linee cellulari JJN-3 e U266 sono state infettate con HSV1716-GFP ad una molteplicità di infezione (MOI) di 0.5 e 5 unità formanti placca (PFU) per cellula. Dopo 24, 48, e 72 ore, l'espressione della proteina reporter green fluorescent protein (GFP) codificata dal virus (si veda paragrafo 2.2 della sezione Approccio Sperimentale) è stata valutata attraverso la tecnica della citometria a flusso. Già dopo 24 ore le cellule JJN-3 e U266 hanno mostrato un'espressione significativa di GFP, dimostrando la suscettibilità delle cellule di mieloma all'infezione di HSV1716. L'infezione con HSV1716 (MOI 5) nelle due linee cellulari ha portato ad una notevole diminuzione del numero di cellule alle 48 e alle 72 ore di infezione rispetto ai controlli. (Si veda **Figura 1a** sopra, destra e sinistra del lavoro in allegato).

Successivamente le cellule JJN-3 sono state infettate con crescenti concentrazioni di HSV1716 utilizzando il range di MOI 0.5-100. Si è visto che dopo 4, 5, e 6 giorni di infezione, il numero di cellule era significativamente inferiore rispetto ai controlli. (Si veda **Figura 1b** destra e sinistra del lavoro in allegato).

HSV1716 (MOI 5) ha ridotto la vitalità cellulare in cellule JJN-3, RPMI-8226, U266, e OPM-2, e questo è stato ulteriormente dimostrato da un aumento delle cellule positive alla colorazione con Ioduro di Propidio dopo 4 giorni rispetto ai controlli. (Si veda **Figura 1c** del lavoro in allegato).

Gli autori hanno anche eseguito un controllo per confermare l'espressione di geni di HSV1716 in cellule di mieloma: hanno osservato come variava la produzione del gene virale transattivatore ICP0 e il gene della replicazione ICP8, in cellule JJN-3 infettate con HSV1716. È stato estratto l'RNA totale e analizzato tramite RT-qPCR per determinare la presenza e il livello di espressione di questi geni. Come previsto, l'infezione con HSV1716 ha aumentato l'espressione di entrambi i geni dopo 8, 16, e 24 ore, quando confrontato con le cellule di controllo, dimostrando l'avvenuta trascrizione virale. (Si veda **Figura 1d** destra e sinistra del lavoro in allegato).

Per accertarsi che HSV1716 non fosse tossico nei confronti di cellule sane, linfociti primari e campioni di midollo osseo (frazioni CD138- CD138+) di donatori sani sono state infettate con HSV1716 (MOI 0.5-5). La vitalità cellulare è stata osservata con citometria a flusso a 4, 5, e 6 giorni dopo l'infezione. Non è stata osservata differenza nella positività al PI tra le cellule controllo e quelle infettate con HSV1716, dimostrando che l'uso di HSV1716 non causa alcun tipo di danno su cellule sane. (Si veda **Figura 1e** destra e sinistra del lavoro in allegato).

Successivamente, sono stati studiati gli effetti di HSV1716 su cellule CD138+ primarie di mieloma isolate da estratti di midollo osseo (MM) o cellule del plasma in pazienti con leucemia (PCL). Le cellule sono state trattate con HSV1716 (MOI 5) e dopo 4 giorni la vitalità è stata osservata con citometria a flusso usando colorazione con PI. Il trattamento con HSV1716 (moi 5) su cellule CD138+ e PCL ha provocato un significativo aumento della morte cellulare quando confrontate con i controlli. C'è stata una importante variazione nelle percentuali di positività al PI rispetto alle cellule di controllo non trattate. Per esempio, nelle cellule di mieloma, questi andavano da un livello minimo di 8,7% ad un massimo di 58,9%. Tuttavia, indipendentemente dal livello basale di morte cellulare, la positività a PI è sostanzialmente aumentata in seguito a terapia virale. Il livello di fold change in pazienti con mieloma, tra il controllo e cellule trattate con HSV1716, era di 2,7. (Si veda **Figura 1f** del lavoro in allegato).

Per determinare se le cellule fossero in grado di riprendersi dopo una infezione a lungo termine con HSV1716, le cellule JJN-3 sono state infettate con HSV1716 ad una MOI di 5 e il numero di cellule è stato valutato a 4, 11, 18 e 25 giorni dopo infezione. Ad ogni time point, le cellule infettate con virus presentavano un numero di cellule inferiore rispetto alle cellule di controllo, ma sono diminuite significativamente soprattutto tra il 18 e 25 giorno. Questo risultato evidenzia l'incapacità delle cellule infettate di riprendersi a seguito di trattamenti duraturi. (Si veda **Figura 1g** del lavoro in allegato).

In ambito clinico, HSV1716 molto probabilmente non verrà usato in monoterapia, ma potrebbe essere usato in coniugazione con terapie standard come Bortezomib. Per questo, al giorno 0 le cellule JJN-3 sono state trattate con Bortezomib (2.5nM), e dopo 2 e 4 giorni si è osservata la vitalità cellulare. Le cellule sono state poi divise in due gruppi: in uno erano trattate con Bortezomib e PBS; nell'altro con Bortezomib associato a HSV1716 (MOI 5). Le cellule trattate unicamente con Bortezomib si sono riprese: la vitalità è ritornata a livelli osservati in cellule di controllo. Invece quando Bortezomib è stato associato a HSV1716, la crescita cellulare è stata impedita, e le cellule sono rimaste ad un livello del 90% di positività al PI tra gli 11 e i 25 giorni, indicando come le cellule tumorali non siano in grado di sopravvivere in seguito a trattamento con HSV1716 e Bortezomib. (Si veda **Figura 1h** del lavoro in allegato).

4.2 HSV1716 INDUCE MORTE CELLULARE ATTRAVERSO APOPTOSI

Per determinare come i virus oncolitici inducano morte cellulare, cellule di mieloma infettate con HSV1716 sono state analizzate con qPCR e citometria a flusso. L'infezione con HSV1716 (MOI 5) ha indotto, dopo 24 ore, un significativo aumento del numero di cellule necrotiche, positive alla duale colorazione con Annexina v e PI in citometria a flusso. Questo risultato è stato confermato da una significativa riduzione del numero di cellule sane.

Per valutare il livello di apoptosi, è stata misurata l'espressione di FASL e BCL2. A seguito dell'infezione con HSV1716, è aumentata l'espressione di FASL del

6601-fold increase dopo 24 ore. Non è invece stata riscontrata alcuna differenza nel gene anti apoptotico BCL2.

Per analizzare ulteriormente l'apoptosi, è stato creato un microarray dei geni che agiscono durante il meccanismo di morte cellulare, che mostra un notevole aumento di espressione di 25 geni pro apoptotici, tra cui CASP9, CASP8, CASP1, BAX, e BID. Per questo motivo HSV1716 potrebbe utilizzare la via apoptotica per indurre morte in cellule di mieloma. (Si veda **Figura 2** del lavoro in allegato).

4.3 TERAPIA A VIRUS ONCOLITICI RIDUCE IL CARICO TUMORALE IN MODELLI MURINI DI MIELOMA

Gli autori hanno voluto determinare l'impatto del trattamento con HSV1716 in modelli murini preclinici. Per testare l'efficacia di HSV1716 sono stati usati 2 modelli in vivo di mieloma (topo con xenotrapianto di JJN-3 e topo singenico con 5TGM11). In entrambi, i topi sono stati trattati sistemicamente con HSV1716 a 1×10^7 PFU. Al giorno 12, i topi con tumori di xenotrapianto JJN-3 sono stati sacrificati e il midollo osseo è stato estratto da femori murini. Il carico tumorale è stato osservato con citometria a flusso con colorazione HLA: il topo JJN-3 di controllo ha presentato un tasso tumorale di $41.78 \pm 0.97\%$, mentre il topo trattato con HSV1716 ha avuto risultato notevolmente inferiori, di $20.73 \pm 5.11\%$. Le sezioni di midollo osseo della tibia sono state analizzate con Immunoistochimica per vedere la presenza di particelle virali di HSV. Le tibie di animali trattati con HSV1716 erano positive per HSV1716, mentre animali trattati con PBS erano negativi. (Si veda **Figura 3a, 3b** destra e sinistra, **3e** del lavoro in allegato).

Per determinare la localizzazione dell'infezione virale, sono state ottenute immagini delle tibie trattate con HVS1716. L'analisi ha dimostrato che particelle virali di HSV sono state rilevate solo in regioni di midollo osseo originate da cellule di mieloma JJN-3. Poiché il mieloma provoca malattie ossee, gli autori hanno analizzato se il trattamento con HSV1716 alterasse i parametri di osso trabecolare, rispetto a cellule di mieloma non infettate. I topi trattati con HSV1716 hanno presentato un volume trabecolare nettamente maggiore rispetto ai topi trattati con PBS; c'è stato un trend dell'aumento dello spessore trabecolare, ma non ha raggiunto un livello significativo. Inoltre, è stato osservato se ci fossero cambiamenti riguardo il rimodellamento osseo. Misure di istomorfometria hanno rivelato la presenza di un trend dell'aumento degli osteoblasti e riduzione degli osteoclasti, ma nemmeno questo ha raggiunto un livello di significatività. (Si veda **Figura 3c** destra e sinistra, **3d** destra e sinistra del lavoro in allegato).

È stata poi testata l'efficacia di HSV1716 in vitro in cellule 5TGM11. Le cellule sono state infettate (MOI 5) e la vitalità è stata osservata dopo 4 e 7 giorni. In contrasto con le linee di cellule di mieloma umano, non c'è stata differenza nella positività a PI dopo 4 giorni. Tuttavia, dopo 7 giorni, la positività a PI delle cellule trattate era significativamente maggiore rispetto ai controlli. Topi con 5TGM11 in vivo sono stati trattati con HSV1716 o PBS e la loro tumorigenicità è stata analizzata istologicamente a seguito di una colorazione a ematosilina e eosina delle tibie. I topi trattati con il virus hanno mostrato riduzioni significative del tasso

tumorale ($28.36 \pm 7.46\%$) rispetto ai topi trattati con il vettore di controllo ($77.94 \pm 5.43\%$). Successivamente è stato analizzato il livello di danno osseo dato dal mieloma tramite micro-CT. Si è notato un trend dell'aumento del volume osseo trabecolare. Tuttavia, era molto meno pronunciato rispetto a quello nel modello di xenotrapianto e non ha raggiunto la significatività; risultati simili sono stati ottenuti per il valore trabecolare. (Si veda **Figura 3f** destra e sinistra, **3g** del lavoro in allegato).

5. DISCUSSIONE

Numerose pubblicazioni hanno dimostrato l'efficacia di HSV1716 in diverse tipologie di tumori, con dati dimostranti l'efficienza preclinica di HSV modificati contro mieloma. Nell'articolo trattato è stato osservato il forte impatto di HSV1716 in 4 linee cellulari di mieloma umano diverse. Il virus ha provocato un aumento della morte cellulare del 50-80% rispetto ai controlli non infettati, grazie alla rapida transattivazione del genoma virale (es. geni ICP0 e ICP8) e all'alto tasso di lisi cellulare. Ha dimostrato specificità nel replicare e lisare unicamente cellule tumorali senza danneggiare cellule sane di midollo osseo, e capacità di impedire ricrescita cellulare e recidività tumorale fino a 25 giorni dopo l'infezione se combinato con trattamenti standard a base di Bortezomib.

Gli autori hanno osservato il metodo grazie al quale HSV1716 induce morte cellulare. L'articolo dimostra come meccanismi di morte cellulare inducano l'attivazione di geni pro-apoptotici come FASL e CASP1/8 e 9. Vista la rapida induzione di morte cellulare, circa 24-48 ore dopo l'infezione, è molto probabile che in cellule di mieloma, HSV1716 sfrutti il meccanismo dell'apoptosi. Precedenti pubblicazioni infatti, suggeriscono che l'apoptosi indotta da HSV avvenga più velocemente rispetto altri meccanismi, quale per esempio morte tramite rottura cellulare che richiede circa 60-70 ore.

L'efficacia della terapia virale è stata riscontrata anche in modelli murini di mieloma. L'iniezione sistemica di HSV1716 in modello con xenotrapianto è risultata in una riduzione del 50% del mieloma, e nel modello immuno-competente 5TGM11, in una riduzione del 63.6%. La diminuzione del livello di tumorigenicità ha avuto effetti pronunciati nel prevenire in vivo malattie ossee indotte dal mieloma nel modello di xenotrapianto, mentre in quello singenico erano meno pronunciati e non significativi. È però difficile comparare queste scoperte con precedenti pubblicazioni: la maggior parte ha usato unicamente modelli subcutanei di mieloma con iniezioni intratumorali. Tuttavia ci sono alcune pubblicazioni che trattano dell'efficacia di altre tipologie di virus oncolitici in modelli murini sistemici di mieloma con risultati simili a quelli dell'articolo.

Tutti i dati raccolti evidenziano l'elevato potenziale di HSV1716 come trattamento anti mieloma sia per la sua elevata specificità replicativa che garantisce un elevato profilo di sicurezza per le cellule sane dell'organismo, sia per la sua capacità di impedire recidive se combinato a terapie convenzionali. Questo articolo, inoltre, dimostra come virus oncolitici possano essere utilizzati per via endovenosa nel trattamento di tumori ematici, e non unicamente per via intratumorale nella cura di tumori solidi. Sfortunatamente però i virus oncolitici non sono ancora stati utilizzati al massimo delle loro potenzialità e sono numerosi gli aspetti ancora sconosciuti di questi trattamenti. Si stanno tutt'ora studiando metodi per: aumentare il delivery virale verso cellule di mieloma nel midollo osseo, e accertare se con HSV1716 l'eliminazione del mieloma residuo sia possibile in seguito a chemioterapia.

BIBLIOGRAFIA

- Brown SM, MacLean AR, McKie EA, Harland J. The herpes simplex virus virulence factor ICP34.5 and the cellular protein MyD116 complex with proliferating cell nuclear antigen through the 63-amino-acid domain conserved in ICP34.5, MyD116, and GADD34. *J Virol.* 1997;71(12):9442-9449. doi:10.1128/JVI.71.12.9442-9449.1997
- Einsele H. Bortezomib. *Recent Results Cancer Res.* 2010;184:173-187. doi:10.1007/978-3-642-01222-8_12
- Fischer AH, Jacobson KA, Rose J, Zeller R. Hematoxylin and eosin staining of tissue and cell sections. *CSH Protoc.* 2008;2008:pdb.prot4986. doi:10.1101/pdb.prot4986
- He B, Gross M, Roizman B. The gamma(1)34.5 protein of herpes simplex virus 1 complexes with protein phosphatase 1alpha to dephosphorylate the alpha subunit of the eukaryotic translation initiation factor 2 and preclude the shutoff of protein synthesis by double-stranded RNA-activated protein kinase. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1997;94(3):843-848. doi:10.1073/pnas.94.3.843
- McKinnon KM. Flow Cytometry: An Overview. *Curr Protoc Immunol.* 2018;120:5.1.1-5.1.11. doi:10.1002/cpim.40
- Mondal M, Guo J, He P, Zhou D. Recent advances of oncolytic virus in cancer therapy. *Hum Vaccin Immunother.* 2020;16(10):2389-2402. doi:10.1080/21645515.2020.1723363
- Reale A, Vitiello A, Conciatori V, Parolin C, Calistri A, Palù G. Perspectives on immunotherapy via oncolytic viruses. *Infect Agent Cancer.* 2019;14:5.. doi:10.1186/s13027-018-0218-1
- Shalhout SZ, Miller DM, Emerick KS, Kaufman HL. Therapy with oncolytic viruses: progress and challenges. *Nat Rev Clin Oncol.* 2023;20(3):160-177. doi:10.1038/s41571-022-00719-w
- Sharma A, Preuss CV. Bortezomib. *StatPearls.* 2022.
- The American Cancer Society. Multiple Myeloma. Last Revised: February 28, 2018. Available online: <https://www.cancer.org/cancer/multiple-myeloma/about/what-is-multiple-myeloma.html> (accessed on 23 May 2023).

Tutte le immagini presenti sono state create con BioRender.com.

APPENDICE

Tazzyman S, Stewart GR, Yeomans J, et al. HSV1716 Prevents Myeloma Cell Regrowth When Combined with Bortezomib In Vitro and Significantly Reduces Systemic Tumor Growth in Mouse Models. *Viruses*. 2023;15(3):603. Published 2023 Feb 22. doi:10.3390/v15030603



viruses



Article

HSV1716 Prevents Myeloma Cell Regrowth When Combined with Bortezomib *In Vitro* and Significantly Reduces Systemic Tumor Growth in Mouse Models

Simon Tazzyman, Georgia R. Stewart, James Yeomans, Adam Linford, Darren Lath, Joe Conner, Munita Muthana, Andrew D. Chantry and Michelle A. Lawson

Special Issue

Structure and Cell Biology of Viral Infection




Edited by
Dr. Hung V. Trinh



<https://doi.org/10.3390/v15030603>

Article

HSV1716 Prevents Myeloma Cell Regrowth When Combined with Bortezomib *In Vitro* and Significantly Reduces Systemic Tumor Growth in Mouse Models

Simon Tazzyman^{1,2,3,†}, Georgia R. Stewart^{1,2,3,†}, James Yeomans^{1,2,3} , Adam Linford^{1,2,3}, Darren Lath^{1,2,3}, Joe Conner⁴, Munitta Muthana³ , Andrew D. Chantry^{1,2,3} and Michelle A. Lawson^{1,2,3,*} 

- ¹ Sheffield Myeloma Research Team, University of Sheffield Medical School, University of Sheffield, Beech Hill Road, Sheffield S10 2RX, UK
- ² Mellanby Centre for Musculoskeletal Research, Medical School, University of Sheffield, Beech Hill Road, Sheffield S10 2RX, UK
- ³ Department of Oncology and Metabolism, University of Sheffield Medical School, University of Sheffield, Beech Hill Road, Sheffield S10 2RX, UK
- ⁴ Sorrento Therapeutics, 4955 Directors Place, San Diego, CA 92121, USA
- * Correspondence: m.a.lawson@sheffield.ac.uk; Tel.: +44-114-2159094
- † Joint First Author.

Abstract: Multiple myeloma remains largely incurable due to refractory disease; therefore, novel treatment strategies that are safe and well-tolerated are required. Here, we studied the modified herpes simplex virus HSV1716 (SEPREHVIR[®]), which only replicates in transformed cells. Myeloma cell lines and primary patient cells were infected with HSV1716 and assessed for cell death using propidium iodide (PI) and Annexin-V staining and markers of apoptosis and autophagy by qPCR. Myeloma cell death was associated with dual PI and Annexin-V positivity and increased expression of apoptotic genes, including CASP1, CASP8, CASP9, BAX, BID, and FASL. The combination of HSV1716 and bortezomib treatments prevented myeloma cell regrowth for up to 25 days compared to only transient cell growth suppression with bortezomib treatment. The viral efficacy was tested in a xenograft (JJN-3 cells in NSG mice) and syngeneic (murine 5TGM1 cells in C57BL/KaLwRijHsd mice) systemic models of myeloma. After 6 or 7 days, the post-tumor implantation mice were treated intravenously with the vehicle or HSV1716 (1×10^7 plaque forming units/1 or 2 times per week). Both murine models treated with HSV1716 had significantly lower tumor burden rates compared to the controls. In conclusion, HSV1716 has potent anti-myeloma effects and may represent a novel therapy for multiple myeloma.

Keywords: oncolytic virus; HSV1716; herpes simplex virus; multiple myeloma; apoptosis; systemic murine models



Citation: Tazzyman, S.; Stewart, G.R.; Yeomans, J.; Linford, A.; Lath, D.; Conner, J.; Muthana, M.; Chantry, A.D.; Lawson, M.A. HSV1716 Prevents Myeloma Cell Regrowth When Combined with Bortezomib *In Vitro* and Significantly Reduces Systemic Tumor Growth in Mouse Models. *Viruses* **2023**, *15*, 603. <https://doi.org/10.3390/v15030603>

Academic Editor: Hung V. Trinh

Received: 30 January 2023

Revised: 17 February 2023

Accepted: 19 February 2023

Published: 22 February 2023



Copyright: © 2023 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

1. Introduction

Multiple myeloma (MM) is a hematological malignancy characterized by the clonal expansion of terminally differentiated B lymphocytes, known as plasma cells, in the bone marrow (BM). It is the second most common hematological malignancy, with an incidence rate that has increased by 66% since the 1970s [1]. Despite substantial improvements being made in overall survival with the introduction of more effective anti-myeloma agents, the disease usually relapses and becomes refractory to treatment, resulting in early death. Therefore, strategies to eliminate residual disease and prevent relapse after chemotherapy are needed.

Recent advances in oncolytic virus (OV) therapy have shown promise in several cancers preclinically and clinically, including myeloma [2–6], with FDA approval of talimogene laherparapvec (T-Vec), a modified herpes simplex virus-1 (HSV-1), which encodes granulocyte–macrophage colony-stimulating factor (GM-CSF), for the treatment

of advanced melanoma [7,8]. OV's preferentially infect and kill malignant cells using multiple mechanisms to eradicate tumor cells, including promoting anti-tumor immune responses [4,9], although OV's are typically modified to enable tumor specificity [10,11].

HSV1716 (SEPREHVIR) is a modified HSV-1 with deletions in both copies of the RL1 gene, encoding the virulence factor ICP34.5. ICP34.5 binds to protein phosphatase 1 α , enabling protein synthesis [12], and proliferating cell nuclear antigen (PCNA), switching it from repair to replication [13]; without ICP34.5, HSV1716 cannot replicate [14]. These mechanisms are disturbed in the tumor setting, ensuring tumor specificity; PCNA is activated in tumors and HSV1716 susceptibility is linked to its expression in cells [15]. Additionally, oncogenes such as RAS and MEK inhibit the PKR pathway, negating the virally induced shutdown of protein synthesis [16]. Preclinical models with HSV1716 in glioma showed a reduced tumor burden and viral persistence, with replication seen only in tumor tissues [17–20]. Similar results have been observed in melanoma [21,22]. Recent investigations show that oncolytic HSVs can infect myeloma cells, induce apoptosis, induce oncolysis in cell lines and primary patient samples, and reduce tumor burden in subcutaneous xenograft models of myeloma [23,24].

Here, we show using *in vitro* assays that HSV1716 is effective at inducing oncolysis in both myeloma cell lines and *ex vivo* primary patient-derived myeloma cells, and when HSV1716 is combined with bortezomib it prevents myeloma cell regrowth. We also show for the first time that HSV1716 significantly reduces tumor burden in systemic xenograft and syngeneic murine models of myeloma.

2. Materials and Methods

2.1. Tissue Culture

Human JJN-3, OPM-2 (DSMZ, Germany), U266 (LGC Standards, London, UK), RPMI-8226 (ATCC[®] (CCL-155TM), Manassas, VA, USA), and murine 5TGM1 (Dr Oyajobi, University of Texas, San Antonio, TX, USA) myeloma cell lines were maintained in complete RPMI medium as previously described [25]. The cell lines were genetically profiled by DSMZ and ATCC using a short tandem repeat (STR) analysis to confirm their identity and were routinely tested for mycoplasma.

Patient samples were acquired under research ethics number 05/Q2305/96 and informed consent was obtained from all subjects involved in the study. Human primary lymphocytes were isolated from waste buffy coats using Ficoll separation as described previously [26]. The peripheral blood mononuclear cell (PBMC) layer was collected and seeded at 7×10^7 cells/flask overnight in IMDM, 2% human AB serum, 1% P/S. Unattached lymphocytes were collected and used in infection experiments. BM aspirates were obtained from myeloma and plasma cell leukemia (PCL) patients and from healthy donors. Primary plasma cells were isolated using magnetic activated cell sorting with CD138⁺ Microbeads (Miltenyi Biotec, Woking, UK). The CD138⁺ and CD138⁻ BM fractions were cultured in complete RPMI medium [25] and DMEM with 2 mM L-glutamine, 10% FCS, and 1% P/S (100 U/100 μ g/mL), respectively. Both cell populations were used in infection experiments.

All tissue culture reagents were from Thermo Fisher Scientific (Runcorn, UK) and all cells were cultured at 37 °C in 5% CO₂ unless stated otherwise.

2.2. HSV1716-GFP Infection Assays

Here, 2×10^5 JJN-3 and U266 myeloma cell lines were infected with HSV1716-GFP (SEPREHVIR[®], provided by Sorrento Therapeutics, San Diego, CA, USA [18]). HSV1716 has GFP inserted into the RL1 gene locus driven by the phosphoglycerate kinase promoter. At 24, 48, and 72 h post-infection, the cells were stained with TO-PRO-3 and the GFP was assessed on viable TO-PRO-3 negative cells using a BD LSRII flow cytometer (BD Biosciences, Wokingham, UK).

2.3. Oncolysis Assays

Cell lines seeded at 10^5 cells/well in 1 mL of medium were exposed to HSV1716 in the range of multiplicity of infection (MOI). Cell death was assessed by propidium iodide (PI) staining (2 μ g/mL) analyzed on an Attune™ Flow Cytometer (Thermo Fischer Scientific, Runcorn, UK).

The combination treatment (bortezomib with HSV1716) was assessed by treating 10^5 cells/well with the vehicle (PBS) or 2.5 nM of bortezomib for 1 day. After 2 and 4 days, the viability was assessed by PI staining using flow cytometry. At day 4, the bortezomib-treated cells were divided into two groups, with half treated with PBS and the other half with HSV1716 (MOI of 5). Their viability was determined after 11, 18, and 25 days.

For primary myeloma patient and healthy donor samples, CD138⁺ cells and CD138⁻ BM or PBMC cells were seeded at 2×10^5 cells/mL of media. Both cell populations were treated with HSV1716 MOI 5 or the vehicle (PBS) control in the presence of 10% autologous serum. After 96 h, cell death was assessed by PI staining using flow cytometry on a BD FACS Calibur system (Becton Dickinson, Oxford, UK). For primary lymphocyte assays, the lymphocyte population was gated using standard FSc and SSc properties and the cell viability and counts were assessed as above.

2.4. ICP0 and ICP8 Gene Expression Analyses

Here, 10^6 JJN-3 cells were infected with control or HSV1716 MOI 5 for 8, 16, and 24 h. The total RNA was isolated from cells using a ReliaPrep RNA cell MiniPrep system (Promega, Southampton, UK) and the cDNA was synthesized using a High-Capacity RNA-to-cDNA kit (Thermo Fisher Scientific). The qPCR was performed using primers specifically targeting the viral genes ICP0 and ICP8 (Table S1) with GAPDH as a housekeeping gene, then assessed using SYBR Green (Primer Design, Southampton, UK) with $2 \times$ SYBR[®] Green Select Master Mix (Thermo Fisher Scientific) and detected with an ABI Prism 7900HT system and SDS 2.1 software (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA).

2.5. Apoptosis Analysis

Here, 10^6 JJN-3 cells were infected with the control or HSV1716 MOI 5 for 8–24 h. The total RNA was isolated, and the cDNA was synthesized as described in Section 2.4. The gene expression levels of FASL (Hs0018225_m1) and BCL2 (Hs04986394_s1) were detected using Taqman assays[®] (Life technologies, Glasgow, UK). Additionally, the cells were infected for 24 h and stained with Annexin-V-APC (Biolegend, London, UK) and PI.

2.6. PrimePCR™ Human Apoptosis Microarray Array

Here, 10^6 JJN-3 cells were infected with the control or HSV1716 MOI 5 for 24 h. The total RNA was isolated, and the cDNA was synthesized as described in Section 2.4. A PrimePCR™ SYBR[®] Green-based microarray (BIO-RAD, Watford, UK) was used to detect the expression of multiple apoptotic genes using RT-qPCR as per the manufacturer's instructions.

2.7. JJN-3 Xenograft Model of Myeloma

The animal procedures were governed by the University of Sheffield UK Home Office License 70/8670 in accordance with the Animal Act 1986. The group sizes were calculated from previous studies [27] with a desired power of 80% and alpha level of 0.05 using a mean of 48.54 and standard deviation of 7.48, with a desired reduction rate of 30% of the tumor burden, giving a sample size of 5.

Ten female 6–7 week-old NSG mice ($n = 5$ /group) received 100 μ L of 10^6 JJN-3 cells by intravenous (i.v.) injection. After 6 days the mice were randomized into 2 groups and treated with 100 μ L of PBS or 10^7 plaque forming units (P.F.U) of HSV1716 by i.v. injection, and treatments were repeated on days 12 and 18 post-tumor inoculation.

Left tibiae and femora, right tibiae, livers, and spleens were fixed in buffered formalin and embedded in paraffin wax. The BM cells of the right femora were flushed with 500 μ L of

PBS and the tumor burden was analyzed using flow cytometry analysis using FITC-labeled anti-human HLA [25].

2.8. 5TGM1 Syngeneic Murine Model of Myeloma

Ten female 6–7-week-old C57BL/6KalWRij mice ($n = 5/\text{group}$) received 100 μL of 10^6 5TGM1 cells by i.v. injection. One week later, the mice were randomized into 2 groups and treated with 100 μL of PBS or HSV1716 (10^7 P.F.U) twice weekly by i.v. injection. The mice were culled after 21 days, and the organs were collected. The tumor burden was assessed via the cell morphology of hematoxylin and eosin (H&E)-stained sections of tibiae.

2.9. Assessment of Tumor Burden

The tibiae from JJN-3 xenograft mice were formalin-fixed, decalcified, and paraffin-embedded. Then, 3 μm sections were stained with anti-HSV antibody (Sorrento Therapeutics, San Diego, CA, USA), then slides were scanned on a Hamamatsu NanoZoomer XR (Hamamatsu, Hertfordshire, UK) and viral infection was assessed in ImageScope (Lieca Biosystems, Newcastle, UK).

Formalin-fixed, decalcified, and paraffin-embedded tibial sections from 5TGM1 syngeneic mice were H&E-stained to assess them for tumor burden, then slides were scanned on a Hamamatsu NanoZoomer XR and viral infection was assessed in ImageScope.

2.10. Assessment of Bone Disease

Tibiae were fixed in 10% formalin and scanned using a SkyScan 1272 system (Bruker, Kontich, Belgium), as previously described [28]. All measurements followed standard guidelines [29]. Next, 3 μm decalcified wax tissue sections were assessed for osteoclasts and osteoblasts as previously described [30].

2.11. Statistical Analyses

The data were assessed for normality using the D'Agostino–Pearson test and relevant parametric or non-parametric statistical tests. Where a normality test could not be performed, normality was assumed and either a student's T-test or ANOVA was applied with a Bonferroni post-test.

3. Results

3.1. HSV1716 Induces Potent Cell Death in Human Myeloma Cell Lines and Primary Patient Samples

JJN-3 and U266 cells were infected with HSV1716-GFP at MOIs of 0.5 and 5. After 24, 48, and 72 h, the GFP expression was assessed by flow cytometry (Figure 1(ai–aiii)). The JJN-3 and U266 cells showed significant GFP expression as early as 24 h, indicating myeloma cell line susceptibility to HSV1716 infection. The JJN-3 cells were infected with increasing concentrations of HSV1716 at MOIs of 0.5–100. After 4, 5, and 6 days of infection, the cell numbers were significantly lower than in the controls (Figure 1(bi)). The HSV1716 (MOI 5) infection resulted in significantly lower cell numbers in JJN-3 and U266 myeloma cell lines at 48 and 72 h compared to the controls (Figure 1(bii)). HSV1716 (MOI 5) reduced the cell viability in JJN-3, RPMI-8226, U266, and OPM-2 cells as indicated by an increase in PI-positive cells after 4 days compared to the control (Figure 1c). To confirm the HSV1716 gene expression in myeloma cells, we investigated the production of the viral transactivator gene ICP0 and replication gene ICP8. As expected, the HSV1716 infection increased the expression of both genes after 8 and 24 h when compared to the control cells, demonstrating viral transcription (Figure 1(di,dii)).

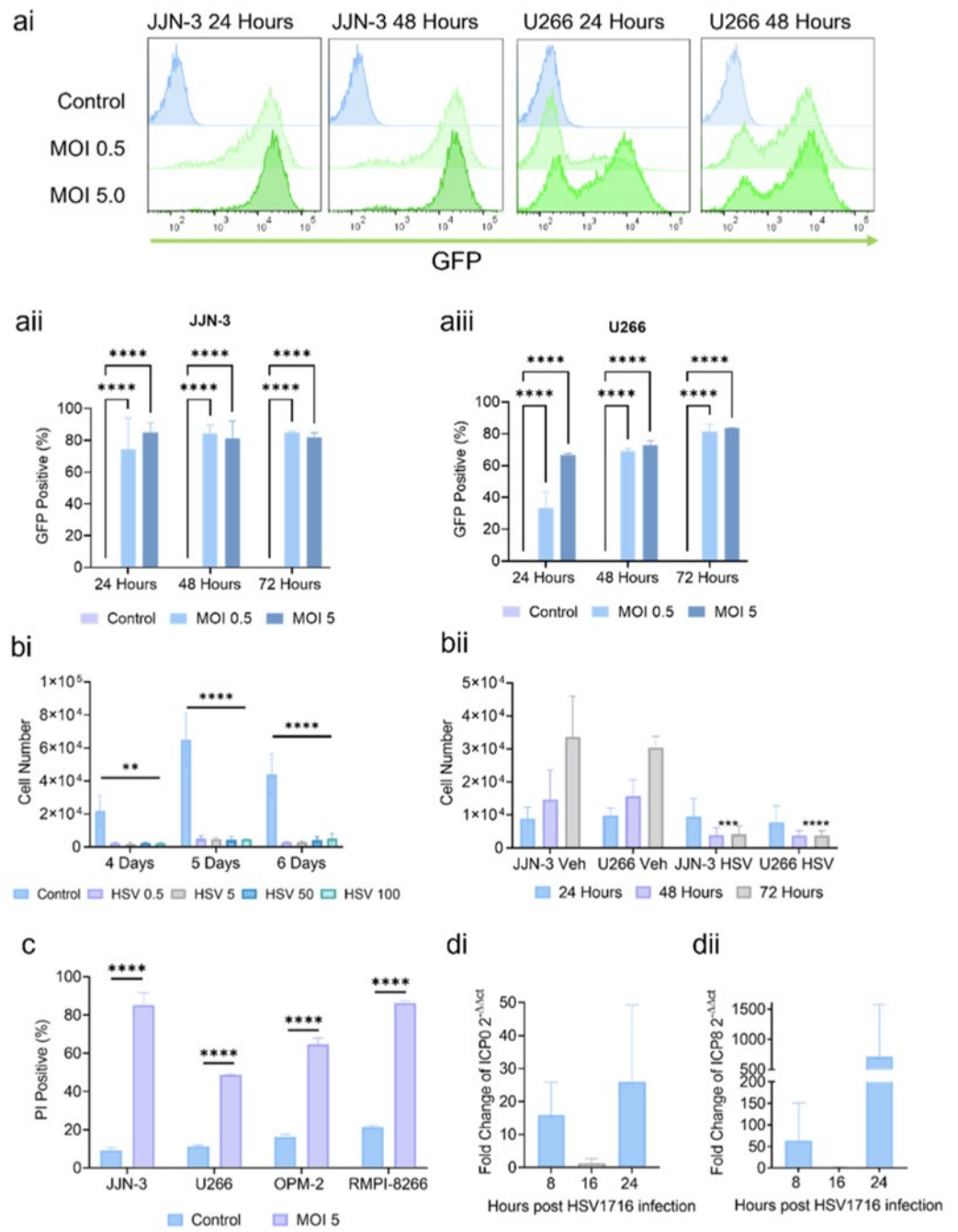


Figure 1. Cont.

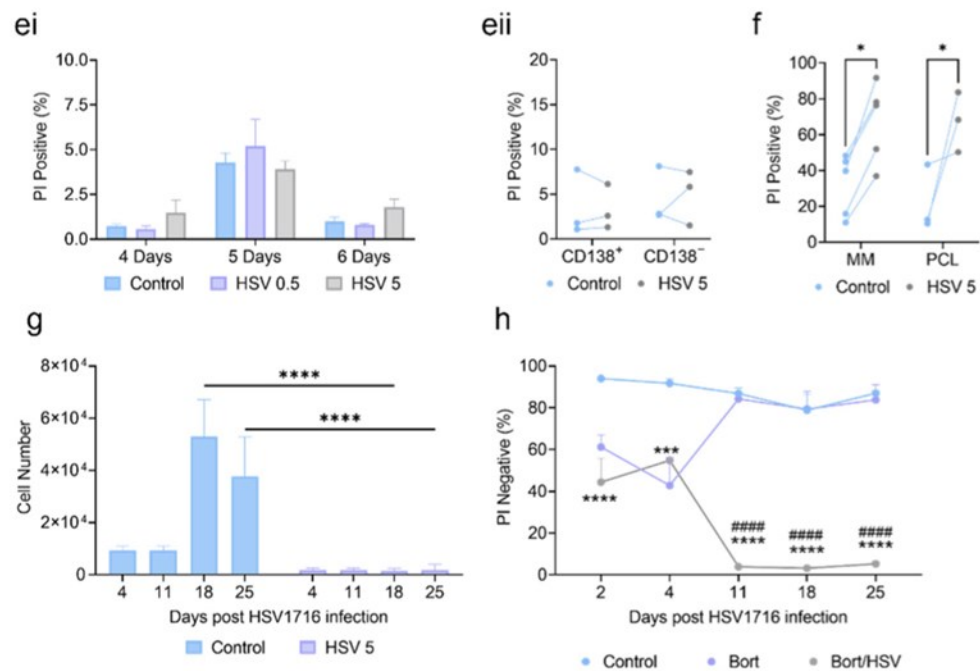


Figure 1. HSV1716 induces potent cell death in myeloma cells. (a) JJN-3 and U266 cells were infected with HSV1716-GFP at an MOI of 0.5 or 5. After 24, 48, and 72 h of infection, GFP expression was assessed using flow cytometry on viable cells. (ai) Representative flow cytometry GFP histogram plots of JJN-3 or U266 cells at 24 or 48 h after infection with the control, HSV1716 MOI 0.5, or HSV1716 MOI 5. GFP expression was plotted in (aii) JJN-3 and (aiii) U266 cells. Data are means \pm SEMs, $n = 3$, **** = $p < 0.0001$ with respect to the control, analyzed using a two-way ANOVA. (b) JJN-3 or U266 cells were infected with HSV1716 at increasing MOIs (5–100). (bi) The cell count analysis shows significant reductions in cell numbers 4 days post-infection. Data are means \pm SEMs, $n = 3$, ** = $p < 0.01$, **** = $p < 0.0001$ with respect to the control, analyzed using a two-way ANOVA. (bii) Analyses at 24, 48, and 72 h showed a rapid response to HSV1716 in both myeloma cell lines. Data are means \pm SEMs, $n = 3$, *** = $p < 0.001$, **** = $p < 0.0001$ with respect to the control, analyzed using a one-way ANOVA. (c) Four myeloma cell lines were infected with HSV1716 for 4 days and the viability was assessed using a flow cytometry analysis of PI-stained cells. All myeloma cell lines showed a significant increase in PI positivity. Data are means \pm SEMs, $n = 3$, **** = $p < 0.0001$ with respect to the control, analyzed using a one-way ANOVA. (d) JJN-3 cells were infected with HSV1716 at an MOI of 5. At 8, 16, and 24 h post-infection, the total RNA was extracted and an RT-qPCR assay was performed to detect viral transactivator and replication genes ICP0 (di) and ICP8 (dii), both of which were significantly upregulated at both 8 and 24 h. (ei) Primary human lymphocytes from healthy donors were infected with HSV1716 at MOIs of 0.5 and 5. Cell viability was assessed 4, 5, and 6 days post-infection using a flow cytometry analysis and showed no significant increase in PI staining at any time point. Data are means \pm SEMs, $n = 3$, analyzed using a one-way ANOVA. (eii) CD138⁺ and CD138⁻ cells isolated from BM aspirates from healthy donors were treated with HSV1716 at MOI 5 and the cell viability was assessed 4 days post-infection using a flow cytometry analysis and PI staining. Data are means, $n = 3$, analyzed using a Student's T-test. (f) CD138⁺ cells isolated from BM aspirates from myeloma (MM) or plasma cell leukemia patients (PCL) who were treated with HSV1716 at an MOI of 5. Cell viability was assessed 4 days post-infection using a flow cytometry analysis and PI staining. HSV1716 induced a significant increase in cell death in primary CD138⁺ MM and PCL cells compared to untreated controls. Data are means, $n = 6$ for MM, $n = 3$ for PCL, * = $p < 0.05$ with respect to the control, analyzed using an ANOVA with Sidak's multiple comparison. (g) Infection of myeloma cells lines with HSV1716 results in a long-term reduction in the myeloma cell number. Infected, but not control, JJN-3 cells showed consistent decreases in number

between 4 and 25 days post-infection. Data are means \pm SEMs, $n = 3$, **** = $p < 0.0001$, with respect to the control, analyzed using a two-way ANOVA. (h) JJN-3 cells were treated with PBS (Control) or 2.5 nM of bortezomib at day 0, after one day the cells were washed to remove bortezomib, and the viability was assessed at day 2 and day 4. Bortezomib groups were then split into two and treated with PBS (bortezomib only) or HSV1716 at MOI 5 (bortezomib + HSV1716). Data are means \pm SEMs, $n = 3$, *** $p = < 0.001$, **** $p = < 0.0001$, # denotes significance between bortezomib HSV176 treatment and bortezomib, * denotes significance between bortezomib HSV1716 treatment and control, analyzed using a two-way ANOVA.

To ensure HSV1716 was not toxic to healthy cells, primary lymphocytes and BM samples (CD138⁻ and CD138⁺ fractions) from healthy donors were infected with HSV1716 (MOI of 0.5 or 5) and the cell viability was assessed at 4, 5, and 6 days post-infection. No difference in PI positivity was seen between the control cells and the HSV1716-infected cells (Figure 1(ei,ei)). Next, we investigated the effects of HSV1716 on primary patient myeloma or plasma cell leukemia (PCL) cells. The cells were treated with HSV1716 (MOI 5) and after 4 days the viability was assessed using PI. The treatment with HSV1716 (Figure 1f) on CD138⁺ cells caused significant increases in cell death when compared to the control-treated groups. There was considerable variation in the percentages of PI positivity in the control-treated cells. For example, in the myeloma cells, these ranged from a low of 8.7% to a high of 58.9%. However, no matter what the basal level of cell death, this was substantially increased following viral therapy. The average fold change for myeloma patients between control and HSV1716-treated cells was 2.7.

To determine if cells recovered after long-term infection, the JJN-3 cells were infected with HSV1716 at an MOI of 5 and the cell counts were assessed at 4, 11, 18, and 25 days post-infection. The virally infected cells had lower cell numbers compared to the control cells at every time point but were significantly decreased in number between days 18 and 25 (Figure 1g). However, if used in a clinical setting, HSV1716 is unlikely to be given as a monotherapy. Instead, HSV1716 would be given alongside such standard therapies as bortezomib. Therefore, the JJN-3 cells were treated with bortezomib, resulting in significant increases in PI staining after 2 and 4 days. The cells treated only with bortezomib recovered, with the viability returning to levels seen in control-treated cells. When bortezomib was combined with HSV1716, cell regrowth was prevented, and the cells remained close to 90% PI-positive between 11 and 25 days (Figure 1h).

3.2. HSV1716 Induces Cell Death via Apoptosis

To determine how oncolytic viruses induce cell death, infected myeloma cells were analyzed by qPCR and flow cytometry. HSV1716 induced a significant increase in the number of dual-stained Annexin-V- and PI-positive necrotic cells (Figure 2(ai,aii)). This was matched by a significant reduction in the number of healthy cells. To further assess apoptosis, the FASL and BCL2 expression was measured. Following the HSV1716 infection, FASL (Figure 2b) showed a 6601-fold increase at 24 h. No difference was seen for the anti-apoptotic BCL2. To further assess apoptosis, a cell death microarray was performed, which showed fold increases in 25 pro-apoptotic genes, including CASP1, CASP8, CASP9, BAX, and BID (Figure 2c). Therefore, HSV1716 may utilize the apoptotic pathway to induce myeloma cell death.

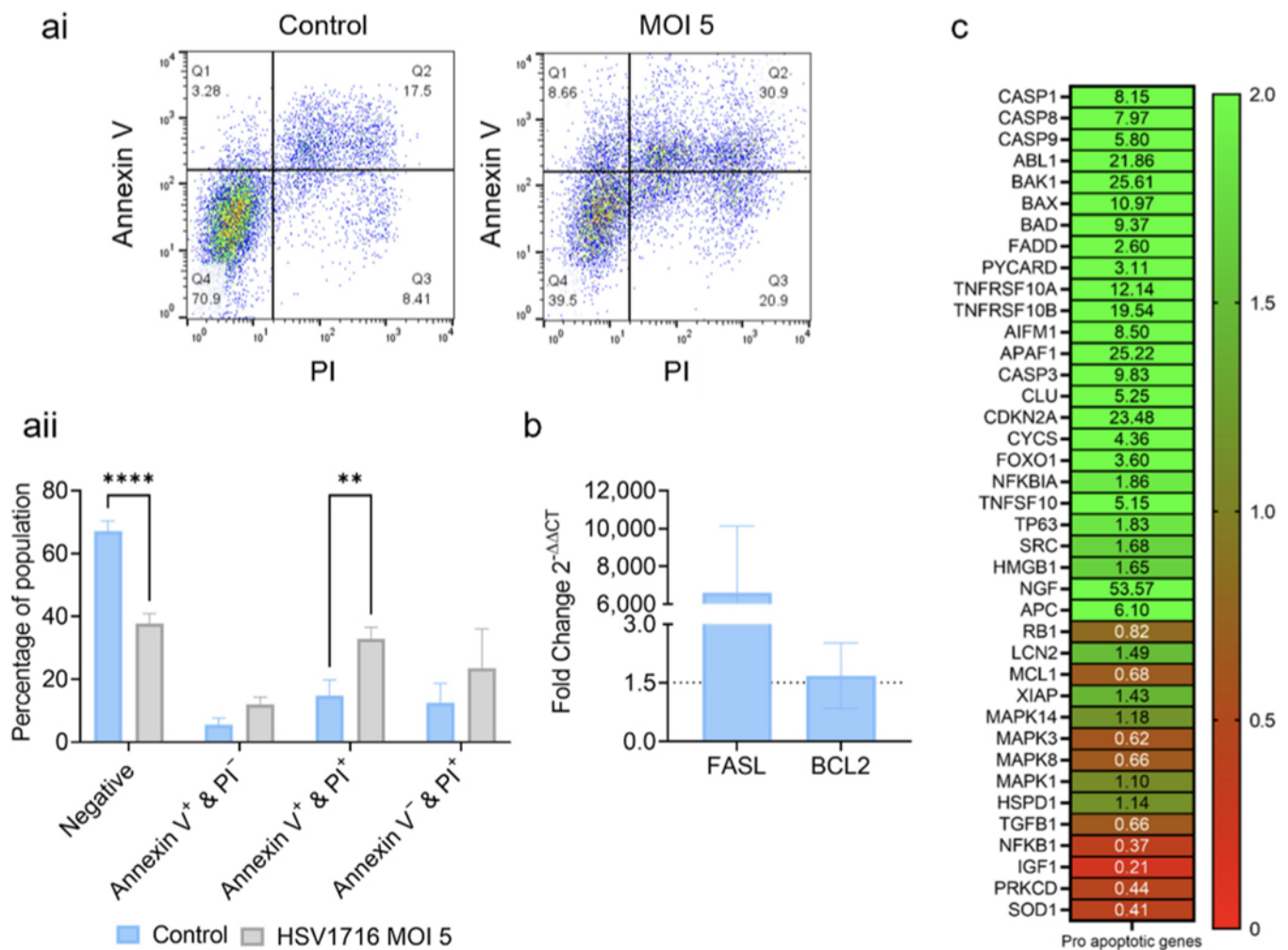


Figure 2. HSV1716 induces tumor apoptosis. JJN-3 cells were infected with HSV1716 at an MOI of 5 for 24 h and a flow cytometry analysis of Annexin-V and PI staining was carried out to assess apoptosis. **(ai)** Flow cytometry scatter plots showing Annexin-V vs. PI staining in control or HSV1716-treated cells. **(a ii)** Percentages of cells in each population after Annexin-V and PI staining. Data are means \pm SEMs, $n = 3$, ** = $p < 0.01$, **** = $p < 0.0001$ with respect to the relevant control, analyzed using a T-test. **(b)** The qPCR analysis of JJN-3 cells 24 h post-infection as fold changes over untreated controls. The analysis for the pro-apoptotic gene FASL and anti-apoptotic gene BCL2 following HSV1716 (MOI 5) treatment. The dotted line indicates the point at which significant upregulation can be seen (1.5-fold increase in expression) Data are means \pm SEMs, $n = 3$. **(c)** JJN-3 cells were infected with control or HSV1716 MOI 5. After 24 h, the total RNA was extracted and cDNA was synthesized. A PrimePCR™ SYBR® Green-based apoptotic microarray (BIO-RAD) was performed to detect apoptotic gene expression via RT-qPCR.

3.3. Oncolytic Virus Therapy Significantly Lowers Tumor Burden in Murine Myeloma Models

The HSV1716 infection reduced the myeloma viability *in vitro* and had little impact on the control cells. We, therefore, wanted to determine the impact of the HSV1716 treatment in preclinical murine models. To test the efficacy of HSV1716 we used 2 *in vivo* models of myeloma (xenograft JJN-3 and the syngeneic 5TGM1) (Figure 3a,e). In both, the mice were treated systemically with HSV1716 at 1×10^7 P.F.U.

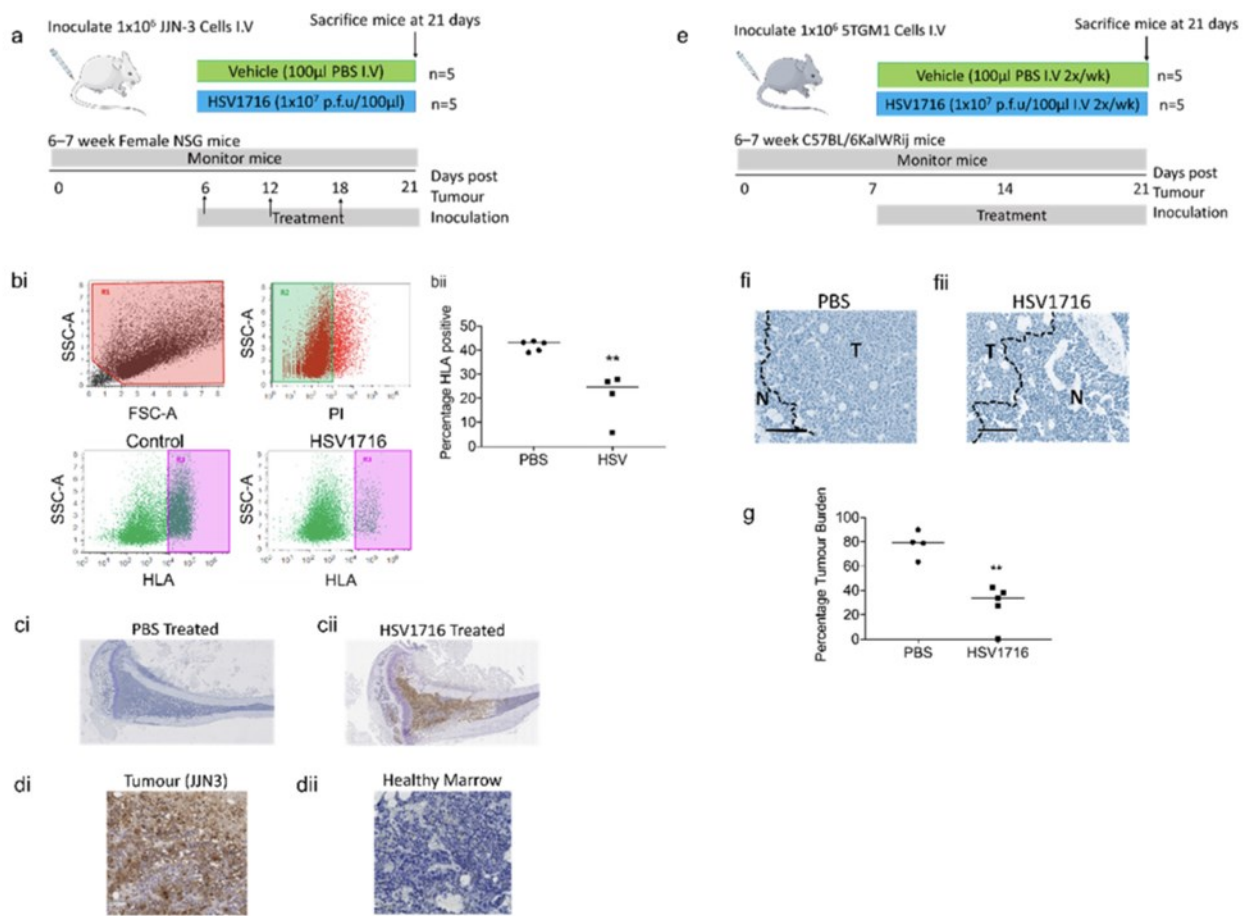


Figure 3. HSV1716 therapy significantly reduces tumor burden in murine models of myeloma. Myeloma xenograft model, (a) 6–7-week-old female NSG mice were inoculated with 1×10^6 JYN-3 cells i.v. via the tail vein. Six days post-tumor inoculation, mice were treated with PBS (vehicle control) or HSV1716 1×10^7 p.f.u./100 μ L i.v. Mice were treated at days 12 and 18, then sacrificed at day 21. (b) At sacrifice, BM samples were flushed from the left tibiae of JYN-3 xenograft mice, labeled with APC-conjugated anti-HLA and analyzed by flow cytometry. Immediately prior to the analysis, the cells were labeled with PI and the viable population was selected (R2). The HLA positivity was then calculated using R3. (bii) The average percentage of HLA positivity (tumor burden) was calculated and a significant reduction in tumor burden was seen following the HSV1716 treatment. Data are means, n = 5 mice per group, ** = $p < 0.01$ unpaired T-test with respect to control. (c) At sacrifice, the tibial bones were fixed and decalcified before paraffin sections were stained for HSV viral particles. Positive staining was only seen in HSV1716-treated mice. Composite images of left tibiae from JYN-3 bearing mice treated with (ci) PBS or (cii) HSV1716, taken at $\times 2$, Bar = 1 mm. In higher magnification images of HSV1716-treated tibiae, viral replication can only be detected in myeloma-infiltrated areas (di) and not primarily normal regions of the same bone (dii), $\times 20$, bar = 100 μ m. In the myeloma syngeneic model, (e) 6–7-week-old female C57BL/6KalWRij mice were inoculated with 1×10^6 5TGM1 cells i.v. via the tail vein. At one week post-tumor inoculation, mice were treated with PBS (vehicle control) or HSV1716 1×10^7 p.f.u./100 μ L i.v. Mice were treated twice/week and sacrificed after 3 weeks. At sacrifice, tibial bones were fixed and decalcified before paraffin sections were stained with hematoxylin and eosin. The tumor percentage area was assessed using random images and ScanScope software, with composite images of tibiae from 5TGM1-bearing mice treated with PBS (fi) or HSV1716 (fii) $\times 10$, bar = 200 μ m. (g) The average percentage of the tumor burden area was calculated and a significant reduction in tumor burden was seen following HSV1716 treatment. Data are means, n = 5 mice per group, ** = $p < 0.01$ unpaired T-test with respect to control.

At day 21, mice bearing xenograft JJN-3 tumors were sacrificed and BM was flushed from mouse femurs. The tumor burden was assessed by HLA staining and flow cytometry; the JJN-3 control mice had a tumor burden of $41.78 \pm 0.97\%$, while the HSV1716-treated mice had a significantly lower tumor burden of $20.73 \pm 5.11\%$ (Figure 3(bi,bii)). The BM sections of tibiae were assessed for HSV viral particles by IHC. The tibiae from HSV1716-treated animals were positive for HSV1716, while the PBS-treated animals were negative (Figures 3(ci,cii) and S1a). To determine the location of viral infection, higher power images of HSV1716-treated tibiae were assessed. The analysis demonstrated that HSV viral particles were only detected in regions of the BM made up of JJN-3 myeloma cells (Figures 3(di,dii) and S1b). Because myeloma induces bone disease, we investigated whether the HSV1716 treatment altered the trabecular bone parameters due to a reduced tumor burden. The HSV1716-treated mice had a significantly higher trabecular volume compared to PBS-treated mice; there was a trend for an increase in trabecular thickness, but this was less pronounced and did not reach significance (Figure S2(ai,aii)). Because of this increase in trabecular bone volume, we investigated whether there were changes to bone remodeling. Histomorphometry measurements revealed that there was a trend for increased osteoblasts and decreased osteoclasts, but this did not reach significance (Figure S3(bi,bii,ci,cii)).

We then tested the efficacy of HSV1716 in the 5TGM1 murine syngeneic model of myeloma [31]. Prior to tumor inoculation, HSV1716 was tested *in vitro* on the 5TGM1 cells. The cells were infected and the viability was assessed after 4 and 7 days (Figure S3a). In contrast to human myeloma cell lines, there was no difference in PI positivity after 4 days. However, after 7 days, the PI positivity in the cells treated at an MOI of 5 was significantly higher than in the controls. *In vivo* 5TGM1-bearing mice were treated systemically with HSV1716 or PBS and their tumor burden was assessed histologically following H&E staining in both tibiae. The virally treated mice showed significant reductions compared to the vehicle-control-treated mice of $28.36 \pm 7.46\%$ and $77.94 \pm 5.43\%$, respectively (Figure 3(fi,fii,g)). We then assessed myeloma bone disease via micro-CT and found there was a trend for an increased trabecular bone volume. However, this was less pronounced than in the xenograft model and did not reach significance; similar results were obtained for the trabecular number (Figure S3(bi,bii)).

4. Discussion

Several previous publications have demonstrated the efficacy of HSV1716 in other cancers [18,26,32–36], with the data showing that modified HSVs have preclinical efficacy in myeloma [23,24]. Our data presented here support the previous publications with important additional details. Our *in vitro* data demonstrate a rapid impact of HSV1716 on four human myeloma cell lines. Significant increases in cell death of 50–80% were achieved when compared to untreated controls. This range of cell death observed here was similar to that seen in other cells *in vitro* (glioma [19] and head and neck cancer [33] for HSV1716) and in myeloma cell lines *in vitro* [24]. We also saw an induction of the viral transactivator and replication genes ICP0 and ICP8, respectively [37]. Gene activation was observed at 8 and 24 h post-HSV1716 infection, but not at 16 h, for both ICP0 and ICP8; at 24 h, this likely represents either a second round of infection or the detection of the viral genome following a potential first round of transactivation at 8 h. This rapid transactivation of the viral genome and tumor lysis was consistent with what has been seen previously with viral particle production and release in the first few days following infection [20,21,38]. Interestingly, Ghose et al. [24] found a modified HSV to not replicate in human myeloma cell lines, as assessed by plaque-forming assays, despite causing cytotoxicity in myeloma cells. However, they found that a replication-competent virus rather than heat-inactivated HSV virus was needed to induce cell cytotoxicity; therefore, they concluded that the HSV-induced cytotoxicity is independent of HSV replication in myeloma cells.

The data presented here demonstrate that HSV1716 is specific for myeloma tumor cells, with minimal or a lack of lysis observed in healthy BM cells flushed from patients.

Importantly, it is often noted that viral therapy is effective against tumor cell lines *in vitro* and *in vivo*, with little impact in a clinical setting. In contrast, we have shown that HSV1716 effectively reduces tumor viability in primary isolated myeloma cells. This is exciting, as the heterogeneity of myeloma tumors presents a potential barrier to these therapies that may not be evident when using cell lines. The heterogeneity of myeloma is well known, with the continual emergence of refractory clones, meaning that viral activity is not guaranteed. Additionally, primary cells tend to proliferate more slowly than cell lines [39,40], which was of particular concern for HSV1716. Ghose et al. published similar findings with a modified HSV and saw a reduction in primary patient-derived myeloma cells. However, cell death was assessed at earlier time points (24 and 48 h), and this was likely to be the reason why they did not observe as high of an effect at the same MOI as what is presented here [24].

Myeloma is a heterogeneous malignancy, with frequent disease relapse and chemoresistance [41] seen in patients. Interestingly, we observed a consistent decrease in cell number and no recovery in tumor cell regrowth for up to 25 days post-infection in JJN-3 cells following treatment with HSV1716 combined with standard-of-care treatment with bortezomib. In other studies, the clonogenic recovery of chemotherapy-treated myeloma cells was observed at 14 to 21 days post-treatment [42]. It is, therefore, possible that long-term treatment with HSV1716 will be successful as a vital and unique component of combined therapy to prevent myeloma regrowth, as HSV1716 kept cell numbers down beyond this time frame. The recovery of tumor cells in a clinical setting is likely to be modulated by the immune system. Activating the immune system will theoretically prevent tumor cell regrowth. Oku et al. found an increased anti-myeloma effect using a modified HSV when myeloma cells were cultured with PBMCs through activating plasmacytoid dendritic cells and natural killer cells. This effect was enhanced when the cells were treated in combination with lenalidomide [23]. Our data combined with the data published by Oku and colleagues suggested the possibility that HSV1716 will be successful at preventing myeloma regrowth alone or as a combined therapy.

The method by which HSV1716 virus induces tumor cell death appears to be via apoptosis. This is in agreement with other studies where HSV-1 has been seen to induce cell death through apoptosis or direct bursting due to viral build-up [43]. Our study demonstrates that cell death leads to the induction of pro-apoptotic genes such as FASL and CASP1, -8, and -9. Previous publications suggest that HSV-induced apoptotic cell death happens quickly, while other mechanisms of cell death are more prolonged. For example, cell death via direct bursting requires 60–70 h before death is observed [43]. Considering these observations and the rapid induction of cell death (just 24–48 h), it is likely that in myeloma HSV1716 induces cell death via apoptosis. These data are in support of the data published by Ghose et al. [24], who demonstrated that myeloma cell lines show increased Annexin-V positivity and increased protein levels of cleaved caspase 3 and cleaved PARP in response to a modified form of HSV. The primary patient-derived myeloma cells also appeared to have increased Annexin-V positivity following modified HSV infection.

The efficacy of viral therapy *in vitro* was matched by similar efficacy in murine myeloma models. The systemic injection of HSV1716 resulted in a significant 50% reduction in myeloma xenografts. A similar efficacy was also seen in the immune-competent 5TGM1 model, which resulted in a significant 63.6% reduction in tumor burden. These data are promising, as they show the modified HSV to have efficacy in a systemic model of myeloma, with the virus being administered systemically. Unfortunately, it is difficult to compare our findings to previous publications using modified HSVs or other OV, as the majority have only used subcutaneous myeloma models with intratumoral injections, which do not have clinical relevance in many myeloma patients, as the systemic cancer forms primarily in the BM. However, there are some publications reporting on the efficacy of OV in systemic murine models of myeloma with similar efficacy to what we observed, such as reovirus, which showed a 50% reduction in tumor burden compared to the control in the 5TGM1 systemic syngeneic model [9].

The reduction in tumor burden observed in the xenograft model had pronounced effects on preventing myeloma-induced bone disease *in vivo*, resulting in the significant inhibition of the tumor-induced loss of trabecular bone volume. This was probably as a direct effect of the decreased tumor volume in HSV1716-treated mice. In the syngeneic model, this inhibition of the tumor-induced loss of trabecular volume was less pronounced and not significant. Histologically, xenograft mice treated with HSV1716 have shown trends for decreased osteoclast numbers and increased osteoblast numbers, although not significantly.

There are emerging studies showing the efficacy of the systemic delivery of viruses in numerous tumor settings, including breast, prostate, and hepatocellular models [11,34,44,45]. In our hands, the anti-myeloma response seen toward HSV1716 therapy is substantial and shows similar efficacy to other studies. Importantly, in our *in vitro* experiments, we observed that HSV1716 not only maintained the long-term inhibition of myeloma cell viability but also prevented the recovery of cell viability once the standard therapy (bortezomib) was removed. These data provide evidence for future murine studies to test combination therapies.

In summary, we have shown that HSV1716 induces oncolysis in myeloma-patient-derived cells, prevents myeloma cell line regrowth when combined with bortezomib, and in systemic murine models HSV1716 alone reduces the myeloma burden. This provides further evidence that HSV1716 could be developed for use in myeloma. If so, it is likely to be combined with conventional myeloma treatments as a method for reducing minimal residual disease. We are now investigating methods for increasing the viral delivery to myeloma cells in the BM using strategies such as cellular delivery [27] or molecular targeting [34], and combining the anti-myeloma treatment with HSV1716 to ascertain whether the elimination of residual myeloma is possible after induction chemotherapy.

Supplementary Materials: The following are available online at <https://www.mdpi.com/article/10.3390/v15030603/s1>. Figure S1. HSV1716 particles found only in tumor areas of HSV1716-treated xenograft mice. Figure S2. HSV1716-treated xenograft mice had increased trabecular volumes. Figure S3. HSV1716 induces delayed cell death *in vitro* in 5TGM1 cells and does not significantly alter the trabecular bone volume in a 5TGM1 syngeneic *in vivo* model. Table S1. SYBR Green primer sequences.

Author Contributions: Conceptualization, A.D.C., M.A.L. and M.M.; methodology, S.T., G.R.S., J.Y., A.L., D.L., J.C. and M.A.L.; validation, S.T., G.R.S. and M.A.L.; writing—original draft preparation, S.T.; writing—review and editing, G.R.S. and M.A.L.; visualization, S.T. and G.R.S.; supervision, A.D.C.; funding acquisition, A.D.C. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Funding: This research was funded by the University of Sheffield (Yorkshire Cancer Research Endowment Release—Pump Priming New Clinical Academic Chairs) and the University of Sheffield Open Access Fund.

Institutional Review Board Statement: The study was conducted according to the guidelines of the Declaration of Helsinki and approved by the Ethics Committee of the University of Sheffield (05/Q2305/96 and 23/10/2012).

Informed Consent Statement: Informed consent was obtained from all subjects involved in the study.

Data Availability Statement: All relevant data can be requested by contacting the corresponding author.

Acknowledgments: We'd like to thank Oyajobi at the University of Texas for providing us with the murine 5TGM1 myeloma cell line.

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest.

References

1. Cancer Research UK. Myeloma Statistics | Cancer Research UK. Myeloma Statistics. 2017. Available online: <https://www.cancerresearchuk.org/health-professional/cancer-statistics/statistics-by-cancer-type/myeloma/survival2018> (accessed on 1 October 2022).
2. Teoh, G.; Chen, L.; Urashima, M.; Tai, Y.T.; Celi, L.A.; Chen, D.; Chauhan, D.; Ogata, A.; Finberg, R.W.; Webb, I.J.; et al. Adenovirus Vector-Based Purging of Multiple Myeloma Cells. *Blood* **1998**, *92*, 4591–4601. [[CrossRef](#)]
3. Kelly, K.R.; Espitia, C.M.; Zhao, W.; Wu, K.; Visconte, V.; Anwer, F.; Calton, C.M.; Carew, J.S.; Nawrocki, S.T. Oncolytic reovirus sensitizes multiple myeloma cells to anti-PD-L1 therapy. *Leukemia* **2018**, *32*, 230–233. [[CrossRef](#)]
4. Wenthe, J.; Naseri, S.; Hellström, A.-C.; Wiklund, H.J.; Eriksson, E.; Loskog, A. Immunostimulatory oncolytic virotherapy for multiple myeloma targeting 4-1BB and/or CD40. *Cancer Gene Ther.* **2020**, *27*, 948–959. [[CrossRef](#)]
5. Lei, W.; Wang, S.; Xu, N.; Chen, Y.; Wu, G.; Zhang, A.; Chen, X.; Tong, Y.; Qian, W. Enhancing therapeutic efficacy of oncolytic vaccinia virus armed with Beclin-1, an autophagic Gene in leukemia and myeloma. *Biomed. Pharmacother.* **2020**, *125*, 110030. [[CrossRef](#)]
6. Dispenzieri, A.; Tong, C.; LaPlant, B.; Lacy, M.Q.; Laumann, K.; Dingli, D.; Zhou, Y.; Federspiel, M.J.; Gertz, M.A.; Hayman, S.; et al. Phase I trial of systemic administration of edmonston strain of measles virus genetically engineered to express the sodium iodide symporter in patients with recurrent or refractory multiple myeloma. *Leukemia* **2017**, *31*, 2791–2798. [[CrossRef](#)]
7. Masoud, S.J.; Hu, J.B.; Beasley, G.M.; Stewart, J.H.; Mosca, P.J. Efficacy of Talimogene Laherparepvec (T-VEC) Therapy in Patients with In-Transit Melanoma Metastasis Decreases with Increasing Lesion Size. *Ann. Surg. Oncol.* **2019**, *26*, 4633–4641. [[CrossRef](#)]
8. Andtbacka, R.H.I.; Collichio, F.; Harrington, K.J.; Middleton, M.R.; Downey, G.; Öhrling, K.; Kaufman, H.L. Final analyses of OPTiM: A randomized phase III trial of talimogene laherparepvec versus granulocyte-macrophage colony-stimulating factor in unresectable stage III-IV melanoma. *J. Immunotherapy Cancer* **2019**, *7*, 145. [[CrossRef](#)]
9. E Müller, L.M.; Migneco, G.; Scott, G.B.; Down, J.; King, S.; Askar, B.; Jennings, V.; Oyajobi, B.; Scott, K.; West, E.; et al. Reovirus-induced cell-mediated immunity for the treatment of multiple myeloma within the resistant bone marrow niche. *J. Immunother. Cancer* **2021**, *9*, e001803. [[CrossRef](#)]
10. Cassady, K.A.; Gross, M.; Roizman, B. The Second-Site Mutation in the Herpes Simplex Virus Recombinants Lacking the γ 134.5 Genes Precludes Shutoff of Protein Synthesis by Blocking the Phosphorylation of eIF-2 α . *J. Virol.* **1998**, *72*, 7005–7011. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
11. Cheng, W.-S.; Dzojic, H.; Nilsson, B.; Tötterman, T.H.; Essand, M. An oncolytic conditionally replicating adenovirus for hormone-dependent and hormone-independent prostate cancer. *Cancer Gene Ther.* **2006**, *13*, 13–20. [[CrossRef](#)]
12. He, B.; Gross, M.; Roizman, B. The γ 134.5 protein of herpes simplex virus 1 complexes with protein phosphatase 1 α to dephosphorylate the α subunit of the eukaryotic translation initiation factor 2 and preclude the shutoff of protein synthesis by double-stranded RNA-activated protein kinase. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1997**, *94*, 843–848. [[CrossRef](#)]
13. Brown, S.M.; MacLean, A.R.; McKie, E.; Harland, J. The herpes simplex virus virulence factor ICP34.5 and the cellular protein MyD116 complex with proliferating cell nuclear antigen through the 63-amino-acid domain conserved in ICP34.5, MyD116, and GADD34. *J. Virol.* **1997**, *71*, 9442–9449. [[CrossRef](#)]
14. Brown, S.M.; Harland, J.; MacLean, A.R.; Podlech, J.; Clements, J.B. Cell type and cell state determine differential in vitro growth of non-neurovirulent ICP34.5-negative herpes simplex virus types 1 and 2. *J. Gen. Virol.* **1994**, *75*, 2367–2377. [[CrossRef](#)]
15. Detta, A.; Harland, J.; Hanif, I.; Brown, S.M.; Cruickshank, G. Proliferative activity and in vivo replication of HSV1716 in human metastatic brain tumours. *J. Gene Med.* **2003**, *5*, 681–689. [[CrossRef](#)]
16. Farassati, F.; Yang, A.-D.; Lee, P.W.K. Oncogenes in Ras signalling pathway dictate host-cell permissiveness to herpes simplex virus 1. *Nature* **2001**, *3*, 745–750. [[CrossRef](#)]
17. Rampling, R.; Cruickshank, G.; Papanastassiou, V.; Nicoll, J.; Hadley, D.; Brennan, D.; Petty, R.; MacLean, A.; Harland, J.; McKie, E.; et al. Toxicity evaluation of replication-competent herpes simplex virus (ICP 34.5 null mutant 1716) in patients with recurrent malignant glioma. *Gene Ther.* **2000**, *7*, 859–866. [[CrossRef](#)]
18. Papanastassiou, V.; Rampling, R.; Fraser, M.; Petty, R.; Hadley, D.; Nicoll, J.; Harland, J.; Mabbs, R.; Brown, M. The potential for efficacy of the modified (ICP 34.5-) herpes simplex virus HSV1716 following intra-tumoural injection into malignant glioma: A proof of principle study. *Gene Ther.* **2002**, *9*, 398–406. [[CrossRef](#)]
19. Harland, J.; Papanastassiou, V.; Brown, S.M. HSV1716 persistence in primary human glioma cells in vitro. *Gene Ther.* **2002**, *9*, 1194–1198. [[CrossRef](#)]
20. Lasner, T.M.; Kesari, S.; Brown, S.M.; Lee, V.M.-Y.; Fraser, N.W.; Trojanowski, J.Q. Therapy of a murine model of pediatric brain tumors using a herpes simplex virus type-1 ICP34.5 mutant and demonstration of viral replication within the CNS. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* **1996**, *55*, 1259–1269. [[CrossRef](#)]
21. Randazzo, B.P.; Bhat, M.G.; Kesari, S.; Fraser, N.W.; Brown, S.M. Treatment of experimental subcutaneous human melanoma with a replication-restricted herpes simplex virus mutant. *J. Invest. Dermatol.* **1997**, *108*, 933–937. [[CrossRef](#)]
22. MacKie, R.M.; Stewart, B.; Brown, S.M. Intralesional injection of herpes simplex virus 1716 in metastatic melanoma. *Lancet* **2001**, *357*, 525–526. [[CrossRef](#)]
23. Oku, M.; Ishino, R.; Uchida, S.; Imataki, O.; Sugimoto, N.; Todo, T.; Kadowaki, N. Oncolytic herpes simplex virus type 1 (HSV-1) in combination with lenalidomide for plasma cell neoplasms. *Br. J. Haematol.* **2021**, *192*, 343–353. [[CrossRef](#)]

24. Ghose, J.; Dona, A.; Murtadha, M.; Gunes, E.G.; Caserta, E.; Yoo, J.Y.; Russell, L.; Jaime-Ramirez, A.C.; Barwick, B.G.; Gupta, V.A.; et al. Oncolytic herpes simplex virus infects myeloma cells in vitro and in vivo. *Mol. Ther.-Oncolytics* **2021**, *20*, 519–531. [[CrossRef](#)]
25. Lawson, M.A.; Paton-Hough, J.M.; Evans, H.R.; Walker, R.E.; Harris, W.; Ratnabalan, D.; Snowden, J.A.; Chantry, A. NOD/SCID-GAMMA mice are an ideal strain to assess the efficacy of therapeutic agents used in the treatment of myeloma bone disease. *PLoS ONE* **2015**, *10*, e0119546. [[CrossRef](#)]
26. Muthana, M.; Giannoudis, A.; Scott, S.D.; Fang, H.-Y.; Coffelt, S.B.; Morrow, F.J.; Murdoch, C.; Burton, J.; Cross, N.; Burke, B.; et al. Use of macrophages to target therapeutic adenovirus to human prostate tumors. *Cancer Res.* **2011**, *71*, 1805–1815. [[CrossRef](#)]
27. 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**, *73*, 490–495. [[CrossRef](#)]
28. Green, A.C.; Lath, D.; Hudson, K.; Walkley, B.; Down, J.M.; Owen, R.; Evans, H.; Paton-Hough, J.; Reilly, G.; Lawson, M.; et al. TGF β Inhibition Stimulates Collagen Maturation to Enhance Bone Repair and Fracture Resistance in a Murine Myeloma Model. *J. Bone Miner. Res.* **2019**, *34*, 2311–2326. [[CrossRef](#)]
29. Bouxsein, M.L.; Boyd, S.K.; Christiansen, B.A.; Guldborg, R.E.; Jepsen, K.J.; Müller, R. Guidelines for assessment of bone microstructure in rodents using micro-computed tomography. *J. Bone Miner. Res.* **2010**, *25*, 1468–1486. [[CrossRef](#)]
30. Dempster, D.W.; Compston, J.E.; Drezner, M.K.; Glorieux, F.H.; Kanis, J.A.; Malluche, H.; Meunier, P.J.; Ott, S.M.; Recker, R.R.; Parfitt, A.M. Standardized nomenclature, symbols, and units for bone histomorphometry: A 2012 update of the report of the ASBMR Histomorphometry Nomenclature Committee. *J. Bone Miner. Res.* **2013**, *28*, 2–17. [[CrossRef](#)]
31. Paton-Hough, J.; Chantry, A.; Lawson, M. A review of current murine models of multiple myeloma used to assess the efficacy of therapeutic agents on tumour growth and bone disease. *Bone* **2015**, *77*, 57–68. [[CrossRef](#)]
32. Mace, A.T.M.; Ganly, I.; Soutar, D.S.; Brown, S.M. Potential for efficacy of the oncolytic Herpes simplex virus 1716 in patients with oral squamous cell carcinoma. *Head Neck* **2008**, *30*, 1045–1051. [[CrossRef](#)]
33. Mace, A.; Harrow, S.; Ganly, I.; Brown, S. Cytotoxic effects of the oncolytic herpes simplex virus HSV1716 alone and in combination with cisplatin in head and neck squamous cell carcinoma. *Acta Oto-Laryngologica* **2007**, *127*, 880–887. [[CrossRef](#)]
34. Conner, J.; Braidwood, L.; Brown, S.M. A strategy for systemic delivery of the oncolytic herpes virus HSV1716: Redirected tropism by antibody-binding sites incorporated on the virion surface as a glycoprotein D fusion protein. *Gene Ther.* **2008**, *15*, 1579–1592. [[CrossRef](#)]
35. Benencia, F.; Courreges, M.C.; Conejo-García, J.R.; Buckanovich, R.J.; Zhang, L.; Carroll, R.H.; Morgan, M.A.; Coukos, G. Oncolytic HSV exerts direct antiangiogenic activity in ovarian carcinoma. *Hum. Gene Ther.* **2005**, *16*, 765–778. [[CrossRef](#)]
36. Braidwood, L.; Learmonth, K.; Graham, A.; Conner, J. Potent efficacy signals from systemically administered oncolytic herpes simplex virus (HSV1716) in hepatocellular carcinoma xenograft models. *J. Hepatocell. Carcinoma* **2014**, *1*, 149–161. [[CrossRef](#)]
37. Boehmer, P.E.; Lehman, I.R. Herpes simplex virus type 1 ICP8: Helix-destabilizing properties. *J. Virol.* **1993**, *67*, 711–715. [[CrossRef](#)]
38. Harrow, S.; Papanastassiou, V.; Harland, J.; Mabbs, R.; Petty, R.; Fraser, M.; Hadley, D.; Patterson, J.; Brown, S.M.; Rampling, R. HSV1716 injection into the brain adjacent to tumour following surgical resection of high-grade glioma: Safety data and long-term survival. *Gene Ther.* **2004**, *11*, 1648–1658. [[CrossRef](#)]
39. Zlei, M.; Egert, S.; Wider, D.; Ihorst, G.; Wäsch, R.; Engelhardt, M. Characterization of in vitro growth of multiple myeloma cells. *Exp. Hematol.* **2007**, *35*, 1550–1561. [[CrossRef](#)]
40. Huang, Y.H.; Almowaled, M.; Li, J.; Venner, C.; Sandhu, I.; Peters, A.; Lavasanifar, A.; Lai, R. Three-Dimensional Reconstructed Bone Marrow Matrix Culture Improves the Viability of Primary Myeloma Cells In-Vitro via a STAT3-Dependent Mechanism. *Curr. Issues Mol. Biol.* **2021**, *43*, 313–323. [[CrossRef](#)]
41. Chaidos, A.; Barnes, C.; Cowan, G.; May, P.; Melo, V.; Hatjiharissi, E.; Papaioannou, M.; Harrington, H.; Doolittle, H.; Terpos, E.; et al. Clinical drug resistance linked to interconvertible phenotypic and functional states of tumor-propagating cells in multiple myeloma. *Blood* **2013**, *121*, 318–328. [[CrossRef](#)]
42. Matsui, W.; Wang, Q.; Barber, J.P.; Brennan, S.; Smith, B.D.; Borrello, I.; McNiece, I.; Lin, L.; Ambinder, R.F.; Peacock, C.; et al. Clonogenic Multiple Myeloma Progenitors, Stem Cell Properties, and Drug Resistance. *Cancer Res* **2008**, *68*, 190–197. [[CrossRef](#)]
43. Coukos, G.; Makrigiannakis, A.; Kang, E.H.; Rubin, S.C.; Albelda, S.M.; Molnar-Kimber, K.L. Oncolytic Herpes Simplex Virus-1 Lacking ICP34.5 Induces p53-independent Death and Is Efficacious against Chemotherapy-resistant Ovarian Cancer. *Clin. Cancer Res.* **2000**, *6*, 3342–3353.
44. Streby, K.A.; Currier, M.A.; Triplet, M.; Ott, K.; Dishman, D.J.; Vaughan, M.R.; Ranalli, M.A.; Setty, B.; Skeens, M.A.; Whiteside, S.; et al. First-in-Human Intravenous Seprehvir in Young Cancer Patients: A Phase 1 Clinical Trial. *Mol. Ther.* **2019**, *27*, 1930–1938. [[CrossRef](#)]
45. Zhu, W.; Wei, L.; Zhang, H.; Chen, J.; Qin, X. Oncolytic adenovirus armed with IL-24 Inhibits the growth of breast cancer in vitro and in vivo. *J. Exp. Clin. Cancer Res.* **2012**, *31*, 1–10. [[CrossRef](#)]

Disclaimer/Publisher’s Note: The statements, opinions and data contained in all publications are solely those of the individual author(s) and contributor(s) and not of MDPI and/or the editor(s). MDPI and/or the editor(s) disclaim responsibility for any injury to people or property resulting from any ideas, methods, instructions or products referred to in the content.