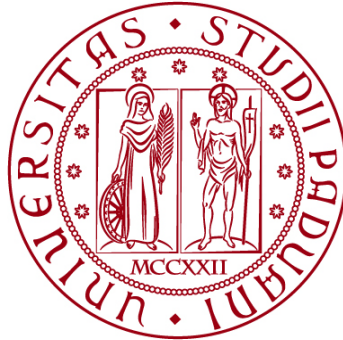


**UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI PADOVA**

**DIPARTIMENTO DI BIOLOGIA**

**Corso di Laurea in Biologia Molecolare**



**ELABORATO DI LAUREA**

**SVILUPPO DI UN VETTORE ONCOLITICO BASATO SUL  
VIRUS DELL'HERPES SIMPLEX INGEGNERIZZATO PER  
RICONOSCERE IN MANIERA ESCLUSIVA IL RECETTORE PER  
IL GDNF GFRa1 AL FINE DI OTTENERE UN'INFEZIONE  
SPECIFICA DEL CANCRO AL SENO**

Tutor: Prof.ssa Arianna Calistri  
Dipartimento di Medicina Molecolare

Laureando: Carlo Junior Albanese

**ANNO ACCADEMICO 2021/2022**



# SOMMARIO

<b>1. ABSTRACT .....</b>	<b>5</b>
<b>2. STATO DELL'ARTE .....</b>	<b>7</b>
2.1 <i>La viroterapia: come i virus possono contribuire nella cura dei tumori .....</i>	7
2.2 <i>Herpes simplex virus 1: un ottimo vettore oncolitico .....</i>	8
2.3 <i>Il tumore al seno: un possibile approccio viroterapico .....</i>	9
<b>3. MATERIALI E METODI .....</b>	<b>11</b>
3.1 <i>Bacterial Artificial Chromosomes .....</i>	11
3.2 <i>Mix enzimatico LR clonasi .....</i>	11
3.3 <i>Saggio delle placche di lisi .....</i>	12
3.4 <i>Western Blot .....</i>	13
3.5 <i>Citometria a flusso .....</i>	14
3.6 <i>Saggio di vitalità cellulare con alamarBlue .....</i>	14
<b>4. APPROCCIO SPERIMENTALE E RISULTATI .....</b>	<b>15</b>
4.1 <i>Ingegnerizzazione del vettore .....</i>	15
4.2 <i>Verifica dell'infezione GFR<math>\alpha</math>1-dipendente in vitro .....</i>	16
4.3 <i>Verifica della lisi delle cellule di tumore al seno GFR<math>\alpha</math>1<sup>+</sup> in vitro .....</i>	17
4.4 <i>Verifica dell'efficacia in vivo .....</i>	18
<b>5. DISCUSSIONE.....</b>	<b>21</b>
5.1 <i>I topi atimici: un modello con delle limitazioni .....</i>	21
5.2 <i>I topi MMTV: modellizzare il tumore al seno in topo .....</i>	22
5.3 <i>I tumori solidi: veicolare un vettore oncolitico nell'organismo .....</i>	23
<b>6. BIBLIOGRAFIA .....</b>	<b>27</b>
<b>7. APPENDICE.....</b>	<b>29</b>





## 1. ABSTRACT

Lo sviluppo degli approcci viroterapici risulta uno dei maggiori campi di ricerca per la cura di svariate forme di tumore. I vettori basati sul virus dell'herpes simplex sembrano essere molto promettenti in tal senso, grazie alle proprietà che questo virus possiede per natura. Nell'articolo di seguito presentato e discusso, si analizza lo sviluppo di un vettore basato su questo virus, ingegnerizzato in modo da infettare esclusivamente le cellule di tumore al seno riconoscendo sulla loro superficie il recettore del GDNF, denominato GFR $\alpha$ 1, il quale risulta sovra-espresso soprattutto a livello delle cellule di questa forma di tumore. Il retargeting, come descritto poi, è stato ottenuto modificando la glicoproteina dell'envelope virale gD in maniera tale da presentare una mutazione nel residuo 38 e da esprimere il ligando specifico del recettore GFR $\alpha$ 1, il GDNF, al posto della sequenza segnale utilizzata solitamente dall'antirecettore del virus per legare i recettori cellulari. Gli esperimenti condotti hanno permesso, quindi, di vagliare l'effettiva dipendenza da GFR $\alpha$ 1 per l'ingresso nelle cellule, l'effettiva crescita e diffusione a livello di colture cellulari GFR $\alpha$ 1<sup>+</sup> *in vitro* e la regressione della massa tumorale a seguito di inoculazione intratumorale *in vivo*. Nella presente tesi, i risultati ottenuti dagli Autori vengono presentati e discussi criticamente.



## 2. STATO DELL'ARTE

### *2.1 La viroterapia: come i virus possono contribuire nella cura dei tumori*

Il termine viroterapia si riferisce oggi all'insieme di tutte le tecniche e di tutti gli approcci terapeutici che utilizzano un virus wild-type o modificato adeguatamente per infettare selettivamente le cellule tumorali e indurre la loro eliminazione senza provocare danni alle cellule sane adiacenti. Nello specifico, si sfruttano soprattutto le capacità litiche di alcuni virus, i quali sono in grado di indurre la morte delle cellule infettate semplicemente replicandovisi all'interno<sup>1</sup>.

L'efficacia terapeutica dei vettori oncovirali si basa sostanzialmente su 2 aspetti precisi quali l'induzione dello sviluppo di un'immunità antitumorale nel paziente trattato e la selettività d'infezione nei confronti delle cellule tumorali.

La stimolazione immunitaria è dovuta alla lisi cellulare e al conseguente rilascio nel microambiente tumorale dei detriti cellulari, degli antigeni virali e degli antigeni tumorali, i quali sono quindi riconosciuti dalle cellule dendritiche. Queste fungono da ponte per l'attivazione dell'immunità adattativa in quanto sono in grado di migrare verso i centri di attivazione dei linfociti T e di stimolarne la maturazione. Si sviluppa così un pool di cellule T CD4<sup>+</sup> e CD8<sup>+</sup> specifiche per il contesto tumorale che può quindi svolgere la propria funzione contro le cellule trasformate.

Alla selettività d'infezione contribuiscono, invece, numerosi fattori diversi, primi fra tutti i meccanismi di ingresso nella cellula bersaglio. Ogni virus, infatti, ha un proprio tropismo specifico che dipende dalla presenza o meno su una data cellula di uno dei recettori riconoscibili per l'entrata. I recettori utilizzabili in un approccio di tipo viroterapico sono, ad esempio, quelli che sono sovra-espressi solo a livello delle cellule tumorali. Il problema, però, è che così non è possibile garantire un ingresso selettivo verso le cellule tumorali, per cui la ricerca si è progressivamente orientata verso il retargeting dei virus al fine di renderli selettivi nei confronti di un recettore esclusivamente tumore-specifico.

Attualmente è utilizzato, per fini terapeutici, un ampio range di virus diversi per dimensioni, genetica, complessità e infettività, ma che sono accumulati dalla capacità innata o acquisita grazie alla presenza di un transgene di causare la lisi delle cellule infettate<sup>1</sup>. Alcuni di questi sono virus wild-type che non sono stati ingegnerizzati in alcun modo se non al fine di ridurre la patogenicità (sono utilizzati infatti dei ceppi destinati allo sviluppo di vaccini). Alcuni esempi sono il reovirus, un virus umano con una ridotta patogenicità per l'uomo; il coxsackievirus, un virus strutturalmente simile al poliovirus; e alcuni virus non umani come il virus della stomatite vescicolare. La maggior parte dei vettori oncolitici utilizzati, però, sono virus ingegnerizzati per migliorare la specificità nei confronti delle cellule tumorali. I principali sono l'herpes simplex virus 1 (HSV-1), il primo vettore oncolitico ad essere stato approvato per l'utilizzo terapeutico; l'adenovirus, il primo vettore

oncolitico ad essere stato testato<sup>1</sup>; e il virus del morbillo, il quale è in grado di indurre la formazione di sincizi multicellulari e quindi la morte cellulare<sup>1</sup>.

## *2.2 Herpes simplex virus 1: un ottimo vettore oncolitico*

Come già riportato in precedenza, l'HSV-1 è uno dei virus oncolitici più utilizzati nell'ambito viroterapico, date le sue potenti proprietà litiche, la facilità con cui esso può essere ingegnerizzato e le profonde conoscenze circa la sua biologia<sup>1</sup>. Si tratta di un virus a dsDNA dotato di envelope che appartiene alla famiglia Herpesviridae e alla sottofamiglia  $\alpha$ , assieme all'HSV-2. L'HSV-1, in particolare, infetta l'uomo a livello della regione oro-facciale, dando luogo ad un vasto range di manifestazioni patologiche che spaziano dalle semplici lesioni alle encefaliti<sup>2</sup>.

Il genoma dell'HSV-1 è costituito da una molecola di DNA a doppio filamento di circa 152 kbp in cui sono distinguibili 2 regioni adiacenti dette  $U_L$  (long) e  $U_S$  (short), ciascuna fiancheggiata da una sequenza ripetuta-invertita e da una sequenza terminale-ripetuta. Le dimensioni del genoma permettono ad esso di codificare almeno 84 polipeptidi diversi, prodotti in un ordine temporale ben preciso. Si possono infatti distinguere 3 gruppi di geni la cui espressione avviene in maniera sequenziale durante il ciclo replicativo del virus, quali i geni precocissimi  $\alpha$ , quelli precoci  $\beta$  e quelli tardivi  $\gamma$ . I geni  $\alpha$  sono espressi già dal primo ciclo di replicazione e codificano dei fattori di trascrizione che permettono l'espressione delle proteine non presenti nel virione; quelli  $\beta$  codificano le proteine coinvolte nella replicazione virale; quelli  $\gamma$ , infine, codificano le proteine strutturali del virione<sup>3</sup>.

Strutturalmente, l'HSV-1 presenta un virione sferico di circa 120 nm di diametro in cui sono distinguibili 3 regioni quali il nucleocapside, l'envelope e il tegumento. Il capside presenta una simmetria icosaedrica e contiene il DNA virale densamente compattato. L'envelope è invece rappresentato da un doppio strato lipidico esterno, a livello del quale si inseriscono le glicoproteine virali responsabili delle interazioni con la cellula bersaglio, dell'ingresso e dell'evasione dalla risposta immunitaria. Il tegumento, invece, occupa lo spazio libero tra il nucleocapside e l'envelope e contiene approssimativamente 20 proteine virali necessarie negli stadi precoci della replicazione virale<sup>3</sup>.

L'ingresso all'interno delle cellule bersaglio avviene secondo vie diverse che dipendono dal tipo cellulare. Ad esempio, l'ingresso nei neuroni avviene a seguito della fusione diretta tra l'envelope lipidico e la membrana cellulare mentre invece l'ingresso all'interno delle cellule epiteliali avviene per endocitosi seguita poi dalla fusione a livello della membrana endosomiale<sup>2</sup>. Se da un lato questi pathways di ingresso sono stati caratterizzati nel dettaglio, dall'altro rimangono ancora incomplete le informazioni riguardanti il ruolo delle proteine virali e di quelle cellulari all'interno di questi stessi processi<sup>2</sup>.

Ciò che è noto è che, tra le glicoproteine di superficie, soltanto gB, gH, gL e gD sono essenziali per l'ingresso all'interno della cellula bersaglio<sup>2,3</sup>. Il modello ad oggi più accreditato prevede che la fusione e l'ingresso nella cellula siano mediate da una

serie di eventi a cascata a cui partecipa sequenzialmente ciascuna di queste 4 glicoproteine. Nello specifico, inizialmente gD si lega ad uno dei 3 recettori cellulari possibili quali la nectina-1, l'Herpesvirus Entry Mediator (HVEM) e l'eparan solfato. Questo induce un cambio conformazionale in gD che ne permette l'interazione con l'eterodimero gH/gL e la sua attivazione. A sua volta gH/gL interagisce con gB e ne attiva la capacità fusogena grazie alla quale si ha l'ingresso del virus<sup>2</sup>.

Tutte queste caratteristiche rendono l'HSV-1 un vettore molto promettente per lo sviluppo di nuovi approcci terapeutici rivolti verso tumori di differente tipo. Non a caso, il primo virus oncolitico ad aver ottenuto nel 2015 l'approvazione per il trattamento del melanoma negli USA da parte della FDA è stato proprio un vettore derivato dall'HSV-1, che prende il nome di talimogene laherparepvec (T-VEC)<sup>1</sup>. Il T-VEC è un vettore oncolitico derivato da un ceppo di laboratorio particolarmente litico detto JS1 opportunamente ingegnerizzato in modo da esprimere il fattore di stimolazione delle colonie di granulociti-macrofagi (GM-CSF). Esso, infatti, difetta dei geni accessori ICP34.5 e ICP47, i quali sono responsabili rispettivamente della neurovirulenza e della down-regolazione dell'esposizione dell'MHC-I<sup>3,4</sup>. In questo modo il vettore perde il tropismo per i neuroni in favore di uno tumore-specifico e al contempo viene aumentata la capacità della cellula infettata di presentare gli antigeni tumorali sulla propria superficie a livello dell'MHC-I, favorendone il riconoscimento da parte delle cellule del sistema immunitario come i linfociti T CD8<sup>+</sup> e le cellule NK. Al posto dei geni rimossi sono state aggiunte altrettante copie del gene per il GM-CSF, poste sotto il controllo del promotore del citomegalovirus, in modo da permettere degli elevati livelli di espressione. Il rilascio locale di GM-CSF ha un effetto di tipo immunostimolatorio in quanto incentiva il reclutamento e la maturazione delle cellule dendritiche<sup>4</sup>. Sembra, poi, che gli anticorpi anti-HSV-1 sierici non alterino la diffusione del virus, la quale può essere controllata grazie alla disponibilità di farmaci in grado di limitare gli eventi replicativi indesiderati<sup>4</sup>. Sebbene il T-VEC abbia inizialmente dato risultati positivi per il trattamento del melanoma, ad oggi si ritiene che esso possa essere efficacemente utilizzato anche per il trattamento di numerosi altri tumori solidi.

### *2.3 Il tumore al seno: un possibile approccio viroterapico*

Il tumore al seno è uno dei target che ad oggi richiamano più attenzione, dato che esso interessa ogni anno milioni di donne in tutto il mondo, presentando una mortalità ancora elevata. A complicare le cose è l'elevata eterogeneità biologica e morfologica che intercorre tra le varie forme tumorali, la quale si ripercuote in maniera diretta sulla responsività ai vari trattamenti disponibili. Attualmente, una delle classificazioni tradizionali più utilizzate si basa sull'espressione o meno di uno tra i recettori per gli estrogeni (ER), per il progesterone (PR) e per il fattore umano di crescita epidermica 2 (HER2)<sup>5</sup>.

L'ER e il PR sono i recettori nucleari per gli ormoni sessuali steroidei, i quali stimolano la crescita dell'epitelio del seno. Il 75% delle forme di tumore al seno

sovra-esprime questi recettori ed è detto ER<sup>+</sup> e PR<sup>+</sup>. Sono forme poco aggressive e altamente responsive alla terapia ormonale. Un piccola percentuale delle forme restanti è positiva solo ad uno dei 2 recettori ed è quindi caratterizzata da una maggiore aggressività e una minore responsività alla terapia ormonale. Il 15% delle forme tumorali è, invece, HER2<sup>+</sup> a causa della duplicazione del corrispondente gene sul cromosoma 17. Il restante 10% è, infine, detto triplo negativo in quanto non sovra-esprime nessuno di questi recettori, per cui si tratta in genere di forme tumorali molto aggressive con una bassa sopravvivenza del paziente<sup>5</sup>.

L'affinamento delle tecniche di sequenziamento ha complicato la classificazione tradizionale permettendo la distinzione di 5 sottotipi differenti detti luminal A, luminal B, HER2-overexpressing, basal-like e normal-like<sup>5</sup>. I primi 2 sono perlopiù ER<sup>+</sup> mentre i restanti sono ER<sup>-</sup>. L'espressione, invece, di HER2 è molto eterogenea in ciascuno dei 5 sottotipi diversi. Nell'insieme, ciascuno di questi sottotipi mostra delle proprietà cliniche e patologiche molto diverse che si sovrappongono solo in parte con la classificazione tradizionale e che quindi richiedono lo sviluppo di approcci terapeutici specifici per ciascuna condizione.

L'articolo oggetto della presente discussione tratta esattamente di un possibile nuovo trattamento del tumore al seno basato su un vettore oncolitico derivato dall'HSV-1 e adeguatamente ingegnerizzato per garantire la specificità d'infezione verso le sole cellule tumorali. Il completo retargeting del vettore è stato ottenuto attraverso l'introduzione di alcune modifiche a livello del genoma virale, in particolare a livello del gene codificante la glicoproteina di superficie gD, la quale, come si è visto in precedenza, è direttamente responsabile della cascata di eventi che determina l'ingresso del virus all'interno della cellula bersaglio. È stata quindi interrotta la capacità di interazione tra gD e i suoi possibili recettori cellulari introducendo una mutazione a livello del residuo 38 (ciò previene il legame con la nectina-1) e sostituendo la porzione N-terminale con la sequenza codificante il ligando di un recettore tumore-specifico (ciò previene il legame con l'HVEM e garantisce un'entrata tumore-specifica). Nell'articolo in questione è stato scelto il recettore  $\alpha 1$  del fattore neurotrofico derivato dalla linea cellulare gliale (GFR $\alpha 1$ ) il quale è espresso a livelli bassi o irrilevabili nelle cellule sane mentre invece è sovra-espresso in circa il 60% delle forme di tumore al seno. Considerando che questa sovra-espressione è correlata di norma con i tumori ER<sup>+</sup>, che questi rappresentano circa il 75% di tutte le forme di tumore al seno e che questi presentano un elevato rischio di morte nel lungo periodo, risulta chiara l'importanza dello sviluppo di un efficace trattamento contro questa specifica forma tumorale.

Questo articolo si affianca ad una letteratura già rigogliosa, nella quale è già stata testata l'efficacia, ad esempio, del retargeting HER2-dipendente, ma occorre ancora una volta sottolineare come l'estrema eterogeneità delle forme di tumore al seno necessiti lo sviluppo di approcci differenti, che possano essere utilizzati sinergicamente e che permettano di ottenere risultati positivi e pieni di speranza.

### 3. MATERIALI E METODI

#### 3.1 *Bacterial Artificial Chromosomes*

Uno dei maggiori problemi legati all'utilizzo dei vettori plasmidici tradizionali è la dimensione massima dei frammenti clonabili, la quale è mediamente di sole poche chilobasi, raggiungendo un massimo di 5-10 kbp. Per ovviare a questi limiti fisici, sono stati sviluppati i Bacterial Artificial Chromosomes (BAC), i quali sono dei vettori, basati sul plasmide F di *E. coli*, che consentono di clonare frammenti di DNA lunghi fino a 300 kbp<sup>6</sup>. Oltre a questo importante aspetto, i principali vantaggi di questi vettori di clonaggio sono la stabilità durante la loro replicazione e l'elevata efficienza di trasformazione in *E. coli*.

La struttura generale di un BAC prevede la presenza di una sequenza di origine della replicazione, la quale è in grado di garantire la stabilità del plasmide mantenendolo in quantità pari a poche copie per cellula (il ridotto numero di copie è utile per limitare le reazioni indesiderate di ricombinazione in grado di alterare in modo non prevedibile l'inserto); dei geni *par*, importanti per dirigere la corretta distribuzione dei cromosomi nelle cellule figlie; un marcatore di selezione, in modo da permettere di vagliare la corretta trasformazione delle cellule; un marcatore di identificazione, in grado di saggiare la presenza nel plasmide dell'inserto di DNA esogeno; e un polylinker, contenente i siti di restrizione riconosciuti dagli enzimi utilizzabili per la linearizzazione del vettore e il clonaggio dell'inserto<sup>6</sup>.

Il clonaggio del frammento di DNA esogeno, che in questo caso corrisponde al genoma ingegnerizzati dell'HSV-1, avviene linearizzando il vettore e il genoma con lo stesso enzima, in modo da rilasciare a livello di entrambe le molecole delle estremità compatibili che possono essere saldate assieme attraverso una reazione di ligazione. Nell'articolo oggetto di questa discussione, il genoma inserito nel vettore risulta floxed, dato che presenta alle proprie estremità un sito *loxP*. I vettori ricombinanti ottenuti possono, quindi, essere utilizzati per la trasfezione di cellule competenti di *E. coli*, le quali sono poi piastrate e selezionate in base ai marcatori di selezione e di identificazione presenti all'interno del BAC.

#### 3.2 *Mix enzimatico LR clonasi*

Il mix enzimatico LR clonasi rappresenta un kit di clonaggio industriale basato sulla ricombinazione conservativa sito-specifica operata dal macchinario del fago  $\lambda$  a livello del genoma di *E. coli*. Il kit contiene, infatti, tutte le componenti del sistema di ricombinazione del fago, opportunamente modificate in modo da migliorarne la specificità e l'efficienza *in vitro*.

Gli eventi di ricombinazione avvengono a livello dei siti di attachment (*att*) R e L, fiancheggiati rispettivamente il DNA bersaglio e quello esogeno che deve essere inserito. Essi fungono da sito di ancoraggio per i complessi enzimatici coinvolti e presentano una sequenza core conservata di 15 bp, sebbene anche le regioni

laterali meno conservate siano importanti per la ricombinazione. A seguito del processo, i siti *attR* e *attL* sono convertiti rispettivamente in *attB* e *attP*.

Il mix enzimatico utilizzato comprende una serie di enzimi in grado di legarsi ai siti *att*, avvicinarli tra loro, tagliarli, scambiare i filamenti e legarli covalentemente. La sua composizione varia a seconda del materiale genetico a disposizione. Se il DNA da inserire è contenuto in un plasmide lineare allora sono necessari l'integrasi (Int), l'excisionasi (Xis) e l'Integration Host Factor (HIF) di *E. coli*. Se, invece, esso è rappresentato da un piccolo frammento lineare, Xis risulta superfluo (in questo caso, *attB* e *attL* sono posti rispettivamente a livello del frammento da inserire e del vettore bersaglio). La diversa composizione ricalca la possibilità del fago  $\lambda$  di utilizzare *in vivo* un ciclo, rispettivamente, lisogenico o litico. Nel caso dell'articolo discusso, è stato utilizzato il primo mix, il quale ha permesso la sostituzione della Gateway (GW) cassette con la sequenza genica modificata codificante gD.

Grazie a questo kit, diventa facile e veloce modificare il plasmide ricombinante di interesse, a patto che le regioni bersaglio siano fiancheggiate dai corretti siti *att*.

### 3.3 Saggio delle placche di lisi

Il saggio delle placche di lisi rappresenta uno dei metodi di titolazione della carica virale di una soluzione a concentrazione ignota di particelle virali in grado di infettare e lisare le cellule bersaglio. Esso si basa sul principio secondo cui l'entità degli effetti citopatici indotti su una coltura cellulare infettata (intesa come il numero di eventi di lisi che si verificano) è proporzionale al numero di particelle virali infettive inoculate.

Operativamente, occorre, per prima cosa, allestire delle diluizioni seriali della soluzione iniziale di particelle virali, inoculando ciascuna diluizione a livello di una diversa coltura cellulare, nelle stesse condizioni sperimentali. Lo scopo delle diluizioni è quello di ridurre gradualmente il numero di particelle inoculate, in modo da ridurre la possibilità che più particelle infettino la stessa cellula. La condizione ideale, infatti, si ottiene quando una singola particella virale infetta una sola cellula della coltura inoculata. Successivamente occorre distribuire l'inoculo su tutta la superficie della coltura, in maniera tale da renderlo omogeneo e limitare gli eventi di co-infezione. Dopo un adeguato tempo di incubazione, si ricopre la superficie della coltura con una sostanza gelatinosa, come l'agar, per impedire che la progenie virale generata dall'infezione possa diffondere verso le cellule adiacenti, infettandole e rendendo impossibile risalire al numero di particelle infettanti presenti nell'inoculo iniziale.

A questo punto vengono contate le placche di lisi, ognuna delle quali corrisponde ad una particella virale che inizialmente ha infettato e ucciso una cellula della coltura. Tipicamente, le piastre più significative sono quelle in cui si contano 50-70 eventi di lisi, dato che, statisticamente, quelle troppo diluite o troppo poco diluite contengono un numero di particelle troppo piccolo o troppo grande che ridurrebbe la sensibilità del metodo. Per la stessa ragione, vengono eseguite più



colture in parallelo, infettate con inoculi alla stessa diluizione, ottenendo così dei dati da poter mediare tra loro. Una volta ottenuto il numero di placche di una coltura, è possibile moltiplicarlo per il fattore di diluizione dell'inoculo rispetto alla soluzione iniziale per ottenere una stima valida del numero di particelle virali in essa contenute. Il risultato viene fornito in unità formanti placca (pfu), inteso come il numero di virioni necessari a formare una placca di lisi.

### *3.4 Western Blot*

Il Western Blot è una tecnica di blotting che permette di rilevare la presenza di una specifica proteina a livello di un campione di interesse, precedentemente separato mediante elettroforesi su gel di poliacrilammide.

La procedura sperimentale prevede che, inizialmente, il campione venga separato mediante elettroforesi su gel, la quale permette alle proteine di essere distinte in relazione alla loro struttura tridimensionale, alla loro carica globale e al loro peso molecolare<sup>6</sup>. A questo punto, le proteine sono trasferite dal gel ad una membrana di nitrocellulosa o di PVDF per permetterne, poi, il rilevamento tramite degli anticorpi specifici. Il trasferimento utilizza un campo elettrico perpendicolare al gel e alla membrana, orientato in modo tale da permettere il passaggio delle proteine verso la membrana. Per favorire il processo, può essere utilizzato anche un buffer di trasferimento in grado di scorrere per capillarità attraverso la membrana, trasportando con sé le proteine del gel. Il corretto trasferimento del campione può essere visualizzato colorando la membrana con un colorante come il Coomassie Brilliant Blue o il rosso Ponceau, i quali possono essere poi lavati via con facilità per non interferire con le fasi successive<sup>6</sup>.

La membrana viene, quindi, bloccata attraverso una serie di lavaggi con una soluzione di albumina di siero bovino (BSA), in modo da saturare i siti della membrana in cui non sono presenti delle proteine legate. In questo modo viene ridotta la possibilità di interazioni aspecifiche tra gli anticorpi, usati in seguito, e la membrana. Infine, si esegue la rilevazione delle proteine di interesse attraverso l'utilizzo di un anticorpo specifico per questa, coniugato con un fluoroforo o un enzima in grado di convertire un substrato incolore in un prodotto colorato, che precipita nel sito in cui viene prodotto<sup>6</sup>. Questa tipologia di rilevazione viene detta diretta, ma essa risulta spesso svantaggiosa data la bassa sensibilità e la scarsa disponibilità di anticorpi specifici coniugati con un tracciante rilevabile. Per tali ragioni, si preferisce una rilevazione di tipo indiretto, durante la quale si utilizza un anticorpo primario diretto contro la proteina di interesse e uno secondario, specifico per quello primario, coniugato con il tracciante rilevabile. Il grande vantaggio di questa tecnica di rilevazione è la capacità di amplificazione del segnale, dovuta al fatto che più anticorpi secondari possono legarsi ad uno stesso anticorpo primario. L'anticorpo primario e quello secondario sono, poi, spesso prodotti in altrettanti animali diversi.

### *3.5 Citometria a flusso*

La citometria (o citofluorimetria) a flusso è una tecnica di laboratorio che permette l'analisi, la quantificazione e la separazione delle cellule di una sospensione liquida monodispersa mediante l'utilizzo di un citofluorimetro.

La tecnica impiega l'utilizzo di anticorpi monoclonali coniugati ad un fluoroforo, in grado di legarsi specificamente ad un preciso antigene cellulare, permettendo di individuare e caratterizzare quali e quante cellule della sospensione lo presentano. Le cellule così marcate sono, quindi, trasportate all'interno del citofluorimetro attraverso un condotto capillare percorso da un liquido in grado di separarle e di disporle ordinatamente in fila. In questo modo, i fasci laser utilizzati possono attraversare singolarmente ciascuna cellula.

L'interazione tra ogni cellula e la luce laser genera dei segnali luminosi diversi a seconda delle sue caratteristiche fisiche e del fatto che vi sia o meno legato il marcatore. I 2 segnali che permettono di identificarne le caratteristiche fisiche sono correlabili alle dimensioni della cellula e alla sua complessità e sono dati, rispettivamente, dai fenomeni di diffrazione e di riflessione/rifrazione. I marcatori fluorescenti legati, invece, possono dare ulteriori informazioni sul tipo cellulare e sulla presenza di alcuni antigeni specifici quali quelli virali, come nel caso del seguente articolo oggetto della presente discussione.

### *3.6 Saggio di vitalità cellulare con alamarBlue*

I saggi di vitalità cellulare sono una serie di tecniche sperimentali utilizzate per valutare lo stato di salute delle cellule di un campione di interesse. Esistono varie modalità tramite cui questo viene analizzato, tra cui quello utilizzato nell'articolo in questione, il quale si basa sul reagente alamarBlue. Esso è un colorante non tossico e permeante che viene utilizzato come indicatore dell'attività cellulare, dato che è in grado di variare il proprio picco di emissione in relazione all'attività metabolica di ossidoriduzione della cellula, senza alterare in alcun modo nessuno dei processi cellulari noti.

La forma ossidata, infatti, prende il nome di resazurina ed è in grado di emettere debolmente nel blu. L'attività metabolica della cellula, però, è in grado di ridurre la resazurina in resorufina, la quale è in grado di emettere brillantemente nel rosso. In questo modo, la continua crescita della cellula mantiene il colorante nella forma ridotta, mentre l'inibizione della crescita e la morte cellulare lo riportano nella forma ossidata. Misurando la fluorescenza nel rosso del campione in esame, diventa, quindi, possibile valutare il numero di cellule vitali, il quale è direttamente proporzionale all'emissione rilevata.

## 4. APPROCCIO SPERIMENTALE E RISULTATI

### 4.1 Ingegnerizzazione del vettore

Il primo fondamentale passaggio esposto nell'articolo è stata l'ingegnerizzazione del vettore oncolitico, al fine di ottenere un ceppo con le caratteristiche necessarie per gli intenti dell'esperimento.

Il genoma dell'HSV-1 di partenza è rappresentato da quello del ceppo KOS, uno dei ceppi di laboratorio più utilizzati assieme a quello 17, inserito all'interno di un BAC e fiancheggiato ad entrambe le estremità da un sito loxP, in modo da permetterne l'escissione attraverso l'azione della CRE ricombinasi. L'utilizzo dei BACs permette il mantenimento stabile del genoma virale all'interno delle cellule di *E. coli* e la sua facile manipolazione attraverso il macchinario di ricombinazione batterica. Il BAC contenente il genoma virale è stato poi inserito nelle cellule batteriche mediante elettroporazione e, quindi, modificato a piacimento mediante ricombinazione omologa. A questo punto, però, il genoma virale non è ancora infettivo, dato che la sua sequenza genica è interrotta dalla sequenza del BAC stesso. È stato, però, sufficiente rimuovere quest'ultimo mediante l'utilizzo della CRE ricombinasi per ripristinare l'integrità genica del virus e la sua infettività. Le particelle complete sono state, poi, ottenute trasfettando il genoma modificato all'interno di una coltura di cellule di mammifero, dove esso può essere espresso.

Successivamente è stato rimosso, tramite ricombinazione, il gene codificante la glicoproteina gD e sostituito con una GW cassette, la quale è necessaria per l'inserimento successivo delle sequenze opportunamente modificate del gene gD. È stato poi inserito anche un gene reporter quale l'mCherry, posto sotto il controllo trascrizionale del promotore dell'ubiquitina C, in modo da permettere la visualizzazione delle cellule infette. Infine, sono state introdotte anche due mutazioni a livello del gene gB, note per favorire il retargeting del virus.

Le modifiche fondamentali per il retargeting sono state, però, eseguite a livello del gene gD, in quanto è stata rimossa la sequenza segnale N-terminale, responsabile del legame all'Herpesvirus Entry Mediator (HVEM), ed è stata sostituita con la sequenza codificante il preproGDNF, il precursore del fattore neurotrofico derivato dalla linea cellulare gliale, in modo da rendere l'ingresso nella cellula bersaglio dipendente dalla presenza del solo GFR $\alpha$ 1. Le sequenze codificanti il dominio transmembrana e quello citoplasmatico di gD sono rimaste invariate. Sono state, poi, aggiunte anche tutte le sequenze necessarie al processamento del preproGDNF e alla sua traslocazione verso l'ambiente extracellulare.

Le sequenze per gD così ottenute sono state, quindi, introdotte nel genoma virale grazie alla reazione catalizzata dalla LR clonasi, generando il vettore d'ora in avanti denominato KNTc-gD:GDNF (figura 1A e 1B dell'articolo in APPENDICE). L'effettivo inserimento è stato verificato mediante restrizione enzimatica, gel elettroforesi in campo inverso, amplificazione della regione contenente il sito di inserzione (con

una coppia di primers specifici per esso) e, infine, sequenziamento dell'amplicone. Le particelle virali infettive sono state, poi, ottenute trasferendo il BAC con il genoma virale ingegnerizzato in alcune cellule esprimenti la nectina-1 sulla propria superficie e purificando successivamente i virioni prodotti. I titoli virali sono stati valutati attraverso il saggio delle placche di lisi.

L'analisi, mediante Western Blot, delle particelle virali purificate ha rivelato la corretta espressione di gD:GDNF, dato che essa ha dimostrato avere un peso molecolare maggiore rispetto a quello della proteina isolata dalle particelle virali wild-type (figura 1C dell'articolo in APPENDICE).

#### 4.2 Verifica dell'infezione GFR $\alpha$ 1-dipendente *in vitro*

Per verificare *in vitro* l'ingresso esclusivamente GFR $\alpha$ 1-dipendente del vettore KNTc-gD:GDNF, è stata quindi allestita l'infezione di una linea cellulare J1.1-2 e di una B78H1 (la prima è una linea di cellule di rene di criceto mentre la seconda una di cellule di melanoma murino), preventivamente ingegnerizzate per esprimere il recettore GFR $\alpha$ 1 e per non presentare sulla propria superficie la nectina-1 e l'HVEM, i recettori cellulari utilizzati normalmente dall'HSV-1 per il suo ingresso. Sono state eseguite varie infezioni a differenti Multiplicity of Infections (MOIs, corrisponde al rapporto tra il numero delle particelle virali inoculate e quello delle cellule della coltura infettata), valutate in base alle unità formanti placca generate dall'infezione della linea cellulare U2OS-ICP4 esprimente il GFR $\alpha$ 1 (d'ora in avanti denominata U2OS-ICP4- GFR $\alpha$ 1).

I risultati sono stati visualizzati 24 ore dopo l'infezione attraverso il rilevamento della fluorescenza emessa dal prodotto del gene reporter mCherry e hanno dimostrato un'efficiente infezione a livello di entrambe le linee cellulari esprimenti il GFR $\alpha$ 1. Al contrario, si è rilevata un'infezione quasi assente a livello delle linee parentali non esprimenti il recettore. In particolare, in entrambi i casi, si è potuto osservare come il numero di cellule infettate decresse in maniera MOI-dipendente (figura 2 dell'articolo in APPENDICE). Ciò dimostra, quindi, un ingresso GFR $\alpha$ 1-dipendente e nectina-1/HVEM-indipendente del vettore KNTc-gD:GDNF.

Le condizioni *in vivo*, però, richiedono lo sviluppo di un vettore che sia del tutto indipendente dal legame con la nectina-1 cellulare (non si fa più riferimento all'HVEM dato che il legame con questo è stato già impedito a seguito della rimozione della sequenza segnale N-terminale di gD). Il residuo di tirosina in posizione 38 sembra essere particolarmente importante per questa interazione, per cui si è proceduto alla generazione del vettore KNTc-gD:GDNF $\Delta$ 38 mediante ricombinazione, all'interno della linea U2OS-ICP4-GFR $\alpha$ 1, tra il vettore contenente la GW cassette al posto del gene per la proteina gD e il vettore contenente la versione mutata di quest'ultimo gene.

L'effettivo retargeting del vettore KNTc-gD:GDNF $\Delta$ 38 è stato, quindi, valutato infettando le linee J1.1-2-GFR $\alpha$ 1 e B78H1-GFR $\alpha$ 1. In parallelo sono state anche allestite le infezioni delle stesse linee con il vettore KNTc-gD:wt, privo di ogni

ingegnerizzazione nei confronti di gD, e le infezioni delle linee J1.1-2-nectina-1 e B78H1-nectina-1 con il vettore KNTc-gD:GDNFΔ38. Si è quindi potuto osservare che, a 24 ore dall'infezione, il vettore KNTc-gD:GDNFΔ38 è stato in grado di penetrare solo all'interno delle cellule delle linee J1.1-2-GFRα1 e B78H1-GFRα1 e non nelle altre, a livello delle quali manca il recettore GFRα1. Al contrario, il vettore KNTc-gD:wt è stato in grado di entrare solo nelle cellule delle linee J1.1-2-nectina-1 e B78H1-nectina-1 e non nelle altre, dato che solo in queste è espresso un recettore che normalmente viene riconosciuto dal virus wild-type. L'infezione delle cellule parentali delle linee J1.1-2 e B78H1, invece, ha generato dei titoli virali bassi o addirittura irrilevabili, dato che esse non esprimono alcun recettore utilizzabile da nessuno dei 2 vettori (figura 3 dell'articolo in APPENDICE).

#### 4.3 Verifica della lisi delle cellule di tumore al seno GFRα1<sup>+</sup> in vitro

Per avvicinarsi sempre più alla condizione *in vivo*, sono state selezionate 4 diverse linee cellulari derivate da altrettante forme di tumore al seno umano, quali la linea MCF7, rappresenta il sottotipo luminale ed è ER<sup>+</sup>; la linea HCC1500, rappresenta il sottotipo luminale ed è ER<sup>+</sup>; la linea MDA-MB-453, rappresenta il sottotipo HER2-overexpressing ed è ER<sup>+</sup>; e la linea MDA-MB-231, rappresenta il sottotipo triplo negativo ed è ER<sup>-</sup> e HER<sup>-</sup>. Soltanto le prime 2 linee presentano dei livelli di GFRα1 utili ai fini sperimentali e questo è in linea con le conoscenze pregresse, secondo cui esiste una certa associazione tra la sovra-espressione di questo recettore e quella dei recettori per gli estrogeni (l'effettiva espressione è stata valutata attraverso un'analisi condotta mediante Western Blot, figura 4A dell'articolo in APPENDICE).

Sono quindi state allestite delle infezioni a livello di tutte le linee tumorali scelte utilizzando sia il vettore non ingegnerizzato, KNTc-gD:wt, che quello retargeted, KNTc-gD:GDNFΔ38. I risultati sono stati valutati analizzando la fluorescenza emessa del gene reporter ed eseguendo una citofluorimetria a flusso utilizzando come bersaglio la glicoproteina virale gB, la quale è espressa a partire da un gene tardivo γ ed è poi incorporata a livello della membrana plasmatica durante il ciclo replicativo virale.

Le cellule delle linee MCF7 e HCC1500 si sono rivelate permissive all'infezione da parte di entrambi i vettori, facendo registrare rispettivamente un numero di cellule infettate pari all'84% e all'80%, nel caso del vettore wild-type, e pari al 69% e al 57%, nel caso del vettore ingegnerizzato. Al contrario, le cellule delle linee MDA-MB-453 e MDA-MB-231 hanno registrato dei tassi di infezione pari al 78% e al 42%, nel caso del vettore wild-type, e pari al 5,3% e al 4,5%, nel caso del vettore ingegnerizzato, a causa della mancanza di espressione del recettore GFRα1 (figura 4B e 4C dell'articolo in APPENDICE).

Per confermare ulteriormente il ruolo di GFRα1 nell'entrata specifica del vettore KNTc-gD:GDNFΔ38, è stata allestita un'infezione utilizzando delle cellule della linea MCF7 trasfettate con un pool di siRNA complementari all'mRNA di GFRα1. Le

cellule sono state incubate e dopo 72 ore è stata valutata l'entrata del vettore allestendo una reazione di immunofluorescenza indiretta rivolta contro la proteina ICP4, codificata da uno dei geni  $\alpha$  precocissimi. I risultati ottenuti sono, quindi, stati confrontati con quelli derivati dall'infezione delle stesse cellule ma trasfettate con un pool di siRNA di controllo non specifici per GFR $\alpha$ 1 e con quelli derivati dalle cellule di controllo non infettate. In accordo con le aspettative, la presenza dei siRNA complementari all'mRNA di GFR $\alpha$ 1 ha ridotto di netto le capacità di ingresso del vettore KNTc-gD:GDNF $\Delta$ 38, a causa della degradazione degli mRNA endogeni codificanti il recettore GFR $\alpha$ 1 tramite i meccanismi di RNA interference cellulari, mentre, invece, non ha alterato quelle del vettore wild-type, essendo questo indipendente da GFR $\alpha$ 1 (figura 5A e 5B dell'articolo in APPENDICE). I livelli di espressione di GFR $\alpha$ 1 sono stati quindi rilevati mediante Western Blot, osservando come effettivamente essi fossero molto bassi nelle cellule trasfettate con i siRNA GFR $\alpha$ 1-specifici. Sembra che anche il pool di controllo abbia ridotto i livelli di espressione del recettore, ma questa riduzione non ha in alcun modo interessato l'ingresso di nessuno dei 2 vettori usati (figura 5C dell'articolo in APPENDICE).

Infine, è stata saggiata la vitalità delle cellule della linea MCF7 e MDA-MB-453 dopo 72 ore dall'infezione da parte di entrambi i vettori. La vitalità cellulare è una misura della proporzione di cellule vive all'interno di una popolazione cellulare effettuata, ad esempio, sfruttando il naturale potere riducente delle cellule vive di convertire una sostanza non fluorescente in una, invece, che lo è. Nel presente articolo è stato utilizzato il kit alamarBlue.

Come previsto, la vitalità delle cellule MCF7 è risultata significativamente ridotta nel caso di entrambe le infezioni, essendo queste cellule GFR $\alpha$ 1<sup>+</sup>, mentre, invece, quella delle cellule MDA-MB-453 è rimasta molto elevata nel caso dell'infezione da parte del vettore KNTc-gD:GDNF $\Delta$ 38 (le percentuali di vitalità non sono state di molto diverse da quelle delle cellule non infettate), essendo queste GFR $\alpha$ 1<sup>-</sup>, ma ugualmente bassa nel caso dell'infezione col vettore wild-type (figura 6A e 6B dell'articolo in APPENDICE). Tutti questi dati, in definitiva, sono in linea con le osservazioni fatte in precedenza e con lo scopo ultimo dell'articolo stesso.

#### *4.4 Verifica dell'efficacia in vivo*

L'ultimo aspetto affrontato durante la procedura sperimentale illustrata è stata la verifica *in vivo* dell'efficacia terapeutica del vettore ottenuto contro il tumore al seno. Si è quindi proceduto all'inoculo subcutaneo di cellule tumorali della linea MCF7 a livello del fianco destro di 6 femmine di topi BALB/c atimici, inducendo così la formazione ectopica del tumore. Una volta raggiunti i 70 mm<sup>3</sup> di volume (circa dopo 22 giorni), è stato iniettato a livello intratumorale il vettore KNTc-gD:GDNF $\Delta$ 38 e si è poi monitorato lo sviluppo del tumore per gli 85 giorni successivi all'inoculo. Per motivi etico-morali, se il volume totale avesse raggiunto i 2000 mm<sup>3</sup> o una dimensione in una qualsiasi direzione di oltre 20 mm, le cavie sarebbero state sopresse. Al pari, nel momento in cui le cavie fossero risultate

incapaci di muoversi o di nutrirsi o il loro peso corporeo fosse diminuito di oltre il 10%, esse sarebbero state eutanizzate. In caso di infiammazione locale e arrossamento a livello del sito di inoculo, si è proceduto alla somministrazione di antibiotici, al fine di minimizzare il rischio di infezione topica. Sono stati allestiti in parallelo, nelle stesse condizioni, degli inculi di controllo, effettuati con PBS al posto del vettore oncolitico.

I risultati sono stati del tutto soddisfacenti, facendo registrare una regressione completa del tumore e l'uccisione totale delle cellule tumorali nei topi inoculati con il vettore, mentre, invece, un aumento della massa tumorale fino ad oltre i 2000 mm<sup>3</sup> in quelli di controllo (figura 6C dell'articolo in APPENDICE). Sembra quindi che, anche *in vivo*, il vettore conservi la propria specificità d'azione e riesca efficacemente ad infettare e ad uccidere le cellule tumorali.





## 5. DISCUSSIONE

### 5.1 I topi atimici: un modello con delle limitazioni

Come descritto in precedenza, gli studi *in vivo* sull'efficacia del vettore generato sono stati eseguiti utilizzando dei topi atimici. I risultati positivi ottenuti, quindi, devono essere analizzati alla luce del modello utilizzato e delle caratteristiche che lo contraddistinguono.

I topi atimici sono dei modelli immunodeficienti che mimano le condizioni tissutali umane in cui si sviluppano normalmente i tumori<sup>7</sup>. Gli studi *in vitro* sulle linee cellulari tumorali, infatti, non permettono uno studio approfondito di quella che è la biologia dei tumori in quanto non è possibile ricreare il microambiente che, invece, è necessario ad essi per proliferare, crescere e, eventualmente, evolversi in metastasi. I topi atimici sono utili, quindi, per studiare lo sviluppo dei tumori senza l'interferenza dovuta all'intervento del sistema immunitario.

Questo modello murino, infatti, è caratterizzato dall'assenza del timo e, come conseguenza, da una ridotta popolazione di linfociti T, i quali sono responsabili dell'immunità verso le cellule infettate da un virus o quelle tumorali<sup>7</sup>. Tutte queste proprietà semplificano il trapianto e l'induzione di un tumore, la quale risulta così attuabile attraverso la semplice inoculazione subcutanea delle cellule tumorali.

Fenotipicamente, i topi atimici sono privi di pelliccia, da cui deriva il nome 'nudi' con cui sono spesso denominati. La base genetica di queste caratteristiche è una mutazione recessiva a livello del gene FoxN1, il quale di norma codifica un fattore di trascrizione coinvolto nell'espressione di molti geni caratteristici delle cellule del sistema immunitario adattativo e del sistema linfoide. Per tali ragioni, negli individui omozigoti per la mutazione, lo sviluppo del timo si arresta poco dopo i primi giorni di vita. I topi che ne derivano mostrano una crescita ritardata, una ridotta fertilità e una ridotta vitalità<sup>7</sup> (dai 6 ai 12 mesi, può essere aumentata nel momento in cui l'individuo cresce in un ambiente completamente asettico).

L'utilizzo di questo tipo di modello rappresenta quindi un vantaggio sotto alcuni punti di vista (ad esempio, in termini di successo dell'impianto), ma non è esente da alcune limitazioni. Esso, infatti, possiede comunque un piccolo numero di linfociti T periferici e mantiene intatta la componente immunitaria innata, tra cui le cellule natural killer (NK), le quali sembrano essere particolarmente sovra-esprese. Tutte queste caratteristiche rendono i topi atimici ideali per gli studi preclinici di nuove sostanze antitumorali o solo per una prima modellizzazione di un tumore prelevato da un paziente per cui si vuole sviluppare una cura mirata<sup>7</sup>.

Esistono, tuttavia, dei modelli migliori per lo studio della crescita dei tumori e del loro trattamento, i quali ricreano delle condizioni più simili a quelle presenti in un paziente umano, pur continuando a lavorare a livello di un ospite murino. Questi modelli prendono il nome di topi umanizzati e sono generati trapiantando in un topo fortemente immunodepresso delle cellule o dei tessuti umani funzionali.

Nel tempo sono stati sviluppati vari ceppi umanizzati trapiantando, ad esempio, gli epatociti, le cellule epiteliali, le isole del pancreas, l'endometrio uterino o le cellule del sistema nervoso<sup>8</sup>, ma, ad oggi, il prototipo di topi umanizzati sono quelli generati utilizzando le componenti del sistema immunitario. Esso, infatti, è uno degli aspetti che più differisce tra l'uomo e il topo, in particolar modo in termini di livelli circolanti di cellule linfoidi e mieloidi, di meccanismi della risposta innata e di pathways di segnalazione mediati dalle cellule T.

La generazione di un ceppo umanizzato richiede, innanzitutto, un ceppo di topi particolarmente immunodepressi, ancora di più dei topi nudi, quali i topi SCID. Essi presentano, infatti, una mutazione nel gene C.B17 che impedisce la completa maturazione sia dei linfociti T (al pari di quanto si ha nei topi atimici) che dei linfociti B (che invece sono funzionali a livello dei topi nudi)<sup>8</sup>. A questo punto, è possibile trapiantare delle cellule staminali emopoietiche umane CD34<sup>+</sup> per permettere lo sviluppo, nell'ospite murino, della maggior parte delle componenti del sistema immunitario umano quali i linfociti B e T, le cellule NK, i macrofagi e le cellule dendritiche. I topi così generati sono in grado di mimare le normali risposte immunitarie umane quali la produzione di anticorpi in risposta ad un antigene inoculato e la citotossicità mediata dalle cellule T<sup>8</sup>.

Anche questi modelli, però, presentano delle limitazioni riguardo, ad esempio, lo sviluppo dei linfociti T e il cambio di classe anticorpale. In aggiunta, i linfociti T generati sono istruiti a livello del timo dell'animale, dove acquisiscono la capacità di discriminare i complessi MHC self da quelli non-self, i quali hanno una specificità diversa in quanto a peptidi riconosciuti rispetto a quelli umani. Per ovviare a questo inconveniente, sono stati sviluppati dei topi in cui è stato trapiantato del tessuto timico fetale umano, riuscendo ad ottenere una corretta istruzione dei linfociti T anche agli antigeni self umani.

Sia i topi atimici che quelli umanizzati, in definitiva, possono essere liberamente utilizzati per osservare *in vivo* lo sviluppo di un tumore e vagliare l'efficacia di varie sostanze antitumorali specifiche, tenendo però conto che in entrambi i casi si tratta di modelli murini, generati *ad hoc* per questi scopi. Il contesto umano *in vivo* risulta, infatti, molto più complicato da affrontare.

### 5.2 I topi MMTV: modellizzare il tumore al seno in topo

Nel caso specifico del tumore al seno, sono stati sviluppati dei modelli murini in grado di ricreare *in vivo* una grande varietà di alterazioni genetiche alla base dell'insorgenza di questa forma di tumore. Ciò è stato possibile grazie all'utilizzo del virus del tumore al seno murino (MMTV), il quale è un virus appartenente alla famiglia Retroviridae in grado di integrarsi nel genoma delle cellule epiteliali della ghiandola mammaria e di indurre l'insorgenza di un tumore nel momento in cui la sua espressione viene attivata<sup>9</sup>. L'attivazione sembra essere frequente durante l'allattamento e sembra essere dovuta all'influenza degli ormoni steroidei, secreti massicciamente durante questa fase. La trasformazione maligna delle cellule è

dovuta all'inserzione del genoma virale, il quale funge da agente inserzionale mutageno e da attivatore trascrizionale nei confronti dei geni adiacenti. È interessante notare, inoltre, come i siti di inserzione siano particolarmente conservati e mappino sempre in prossimità di alcuni oncogeni la cui espressione risulta alterata anche in numerose forme di tumore al seno umano<sup>9</sup>.

Ad oggi sono stati generati oltre 50 ceppi di topi MMTV, ciascuno transgenico nei confronti di uno o più degli oncogeni cellulari che normalmente sono associati alla tumorigenesi al seno, in quanto mutati o sovra-espressi (alcuni esempi sono la ciclina D1, la ciclina E, Ras, c-myc, Wnt1 e c-rel)<sup>9</sup>. L'espressione dei transgeni è a carico di uno dei promotori forti dell'MMTV, primo fra tutti quello contenuto nelle sue Long Terminal Repeats (LTRs), dato che esso è attivo sia durante l'allattamento che durante il resto della vita dell'ospite. La maggior parte di questi geni sono coinvolti nella cascata di segnalazione mediata dalle cicline D (D1, D2 e D3), la cui induzione avviene durante la risposta precoce della cellula ad un fattore di crescita. La presenza del mitogeno, infatti, attiva la sintesi delle chinasi ciclina-dipendenti (Cdk) 4 e 6, le quali si complessano con le cicline D promuovendo l'avanzamento del ciclo cellulare nella fase G<sub>1</sub> tramite la fosforilazione di pRb (il prodotto di uno dei maggiori oncogeni cellulari). L'accumulo dei complessi ciclina D-Cdk induce, di norma, il reclutamento di alcuni inibitori che ne sopprimono l'attività. In questo modo, viene attivato il rilascio del fattore di trascrizione E2F e la sintesi di alcuni geni fondamentali per la regolazione del ciclo cellulari.

L'uso di questi modelli permette, quindi, di ottenere numerose informazioni sulla cascata di segnalazione intracellulare che governa l'eziologia di numerose forme di tumore al seno, nonostante le differenze morfologiche e ormonali che separano l'uomo dal topo. Data la problematicità legata alla cura di questa particolare forma di tumore, risulta essenziale riuscire ad identificare nel dettaglio tutte le possibili alterazioni genetiche che possono essere utilizzate come indicatore prognostico dell'inizio della trasformazione maligna, al fine di sviluppare approcci terapeutici sempre più efficaci e specifici<sup>9</sup>.

Sebbene i tumori sviluppati da questi modelli siano indistinguibili da quelli che sorgono nell'uomo, vi sono comunque delle limitazioni. Il 50% delle forme umane, infatti, è ER<sup>+</sup>, mentre invece quelle murine sono solitamente ER<sup>-</sup>. In aggiunta, l'elevata mortalità associata al tumore al seno è dovuta alla metastasi, la quale nell'uomo interessa i polmoni, i linfonodi, le ossa e il fegato, mentre invece nei modelli MMTV solo i polmoni<sup>9</sup>. Lo sviluppo di un modello in grado di riprodurre *in vivo* lo sviluppo metastatico del tumore al seno rimane, perciò, ancora aperto.

### *5.3 I tumori solidi: veicolare un vettore oncolitico nell'organismo*

Un ultimo aspetto interessante dei risultati ottenuti sperimentalmente è il fatto che essi siano riferiti al trattamento di un tumore al seno ectopico, dato che le cellule tumorali sono state iniettate a livello del fianco e che qui hanno dato origine alla massa tumorale analizzata e trattata. L'inoculazione intratumorale, quindi, è

risultata essere il miglior modo per veicolare *in vivo* il vettore oncolitico generato, unita al fatto che l'utilizzo di topi nudi facilita la visualizzazione ad occhio nudo della massa tumorale in crescita. Il tumore al seno, però, al pari di molti altri tumori solidi, non si sviluppa così in superficie, ma forma delle masse profonde nel tessuto che non necessariamente risultano trattabili in questa maniera.

Esiste, infatti, una florida ricerca scientifica che mira a sviluppare degli approcci più efficaci per la veicolazione *in vivo* dei vettori oncolitici, in maniera tale da agire anche a livello di tumori solidi profondi e svariatamente localizzati nell'organismo. In teoria, l'iniezione intravenosa sarebbe il metodo migliore per bersagliare il tumore primario e, eventualmente, anche le metastasi. In pratica, però, questo approccio presenta numerosi lati negativi, in quanto in questo modo viene indotta una risposta immunitaria capace di neutralizzare il vettore prima ancora che esso abbia raggiunto la massa tumorale (gli effetti sono tanto più marcati quanto più il virus da cui deriva il vettore è diffuso nella popolazione, come nel caso dell'HSV-1)<sup>10</sup>. Per tale ragione, il metodo per eccellenza rimane l'iniezione intratumorale, la quale, però, è in grado di agire solo a livello del tumore primario e, solo in maniera molto limitata, anche a livello delle metastasi.

Per riuscire a veicolare il vettore virale a livello del tumore di interesse, occorre, quindi, sviluppare un approccio del tutto diverso. A tal scopo, sono in fase di studio le cellule carrier, le quali permettono di essere infettate *ex vivo* con il vettore oncolitico e, una volta inoculate, di proteggerlo all'interno dell'organismo fino al tessuto bersaglio. In questo modo viene migliorata la distribuzione del vettore, viene aumentata la sicurezza del trattamento, vengono ridotte le dosi da somministrare e vengono limitati gli effetti off-target<sup>10</sup>.

Attualmente, sono molti i tipi cellulari studiati come carrier per i vettori oncolitici. Per fungere da carrier ottimale, occorre che la cellula scelta presenti un tropismo specifico per il tumore, consenta l'internalizzazione nella cellula bersaglio delle particelle di vettore trasportate e presenti una vitalità sufficiente a permettere una corretta veicolazione del vettore attraverso la circolazione sanguigna. Per evitare, poi, fenomeni di rigetto, è preferibile utilizzare delle cellule autologhe<sup>10</sup>.

Le cellule più utilizzate sono le cellule mesenchimali staminali, le quali sono dotate di attività immunosoppressiva, grazie alla quale reprimono la risposta immunitaria antivirale che viene attivata nel momento in cui l'organismo percepisce la presenza del vettore virale replicante. Si è, però, osservato che tale risposta può amplificare l'efficacia del trattamento antitumorale, sinergizzando con l'azione litica del vettore virale. Per tale ragione, gli studi si sono ampliati nei confronti dei linfociti T, dei monociti e delle cellule neuronali staminali.

I linfociti T risultano utili in quanto sono in grado di circolare liberamente nel sangue fino a raggiungere, poi, il tumore bersaglio verso cui possono espletare la propria azione citotossica. Si è dimostrato anche che è possibile far esprimere le proteine fusogeniche virali sulla superficie di queste cellule per permettere la fusione con le cellule tumorali e l'internalizzazione del vettore oncolitico<sup>10</sup>. Il

grande limite, però, risiede nel fatto che molti tumori solidi sviluppano un microambiente che rallenta o preclude la penetrazione dei linfociti, vanificando l'azione oncolitica e citotossica da essi mediata. Più promettenti sono, invece, i monociti, i quali appartengono a quelle cellule mieloidi in grado di infiltrarsi a livello tumorale. Questa è, infatti, una caratteristica comune di molti tumori solidi, ragion per cui i monociti e i macrofagi (la forma tissutale dei monociti) richiamano sempre più interesse. Si tratta di un tipo cellulare facilmente prelevabile a partire dal sangue periferico e che può essere coltivato, espanso e differenziato *in vitro*. Essendo, poi, una componente comune di molte forme tumorali differenti, è improbabile che il tumore sviluppi una qualsiasi forma di immunità contro esso<sup>10</sup>. Le cellule neuronali staminali, infine, sono perlopiù utilizzate per la veicolazione di vettori a livello cerebrale, grazie alle loro capacità migratorie all'interno del parenchima del cervello.

Alla luce delle svariate modalità con cui può essere veicolato *in vivo* il vettore oncolitico ingegnerizzato, i risultati sperimentali ottenuti nell'articolo oggetto della presente discussione risultano poveri di risvolti concreti. Ciononostante, si tratta solo del primo di una lunga serie di passi sperimentali, che un giorno, forse, permetteranno lo sviluppo di un approccio efficace e sicuro per la cura di un male, come il tumore al seno, che ancora oggi risulta difficile da combattere.



## 6. BIBLIOGRAFIA

1. Lawler SE, Speranza MC, Cho CF, Chiocca EA. Oncolytic Viruses in Cancer Treatment: A Review. *JAMA Oncol.* **2017** Jun 1;3(6):841-849.  
doi: 10.1001/jamaoncol.2016.2064. PMID: 27441411.
2. Hilterbrand AT, Daly RE, Heldwein EE. Contributions of the Four Essential Entry Glycoproteins to HSV-1 Tropism and the Selection of Entry Routes. *mBio.* **2021** Mar 2;12(2):e00143-21.  
doi: 10.1128/mBio.00143-21. PMID: 33653890; PMCID: PMC8092210.
3. Arduino PG, Porter SR. Herpes Simplex Virus Type 1 infection: overview on relevant clinico-pathological features. *J Oral Pathol Med.* **2008** Feb;37(2):107-21.  
doi: 10.1111/j.1600-0714.2007.00586.x. PMID: 18197856.
4. Harrington KJ, Puzanov I, Hecht JR, Hodi FS, Szabo Z, Murugappan S, Kaufman HL. Clinical development of talimogene laherparepvec (T-VEC): a modified herpes simplex virus type-1-derived oncolytic immunotherapy. *Expert Rev Anticancer Ther.* **2015**;15(12):1389-403.  
doi: 10.1586/14737140.2015.1115725. PMID: 26558498.
5. Tsang JYS, Tse GM. Molecular Classification of Breast Cancer. *Adv Anat Pathol.* **2020** Jan;27(1):27-35.  
doi: 10.1097/PAP.000000000000232. PMID: 31045583.
6. Barcaccia G, Falcinelli M. Genetica e genomica vol. 2. *Liguori.* **2012**
7. Szadvari I, Krizanova O, Babula P. Athymic nude mice as an experimental model for cancer treatment. *Physiol Res.* **2016** Dec 21;65(Suppl 4):S441-S453.  
doi: 10.33549/physiolres.933526. PMID: 28006926.
8. Fujiwara S. Humanized mice: A brief overview on their diverse applications in biomedical research. *J Cell Physiol.* **2018** Apr;233(4):2889-2901.  
doi: 10.1002/jcp.26022. Epub 2017 Jun 15. PMID: 28543438.
9. Taneja P, Frazier DP, Kendig RD, Maglic D, Sugiyama T, Kai F, Taneja NK, Inoue K. MMTV mouse models and the diagnostic values of MMTV-like sequences in human breast cancer. *Expert Rev Mol Diagn.* **2009** Jul;9(5):423-40.  
doi: 10.1586/erm.09.31. PMID: 19580428; PMCID: PMC2759974.
10. Reale A, Calistri A, Altomonte J. Giving Oncolytic Viruses a Free Ride: Carrier Cells for Oncolytic Virotherapy. *Pharmaceutics.* **2021** Dec 18;13(12):2192.  
doi: 10.3390/pharmaceutics13122192. PMID: 34959474; PMCID: PMC8709025.





## 7. APPENDICE

Di seguito si allega l'articolo oggetto della precedente discussione.

Hall BL, Leronni D, Miyagawa Y, Goins WF, Glorioso JC, Cohen JB. Generation of an Oncolytic Herpes Simplex Viral Vector Completely Retargeted to the GDNF Receptor GFR $\alpha$ 1 for Specific Infection of Breast Cancer Cells. *Int J Mol Sci.* **2020** Nov 21;21(22):8815.

doi: 10.3390/ijms21228815. PMID: 33233403; PMCID: PMC7700293.





Article

# Generation of an Oncolytic Herpes Simplex Viral Vector Completely Retargeted to the GDNF Receptor GFR $\alpha$ 1 for Specific Infection of Breast Cancer Cells

Bonnie L. Hall <sup>1,\*</sup>, Daniela Leronni <sup>1,2</sup> , Yoshitaka Miyagawa <sup>1,3</sup>, William F. Goins <sup>1</sup>, Joseph C. Glorioso <sup>1</sup> and Justus B. Cohen <sup>1,\*</sup>

<sup>1</sup> Department of Microbiology and Molecular Genetics, University of Pittsburgh, Pittsburgh, PA 15219, USA; DAL118@pitt.edu (D.L.); yoshitaka-miyagawa@nms.ac.jp (Y.M.); goins@pitt.edu (W.F.G.); glorioso@pitt.edu (J.C.G.)

<sup>2</sup> Department of Neurological Surgery, University of Pittsburgh, Pittsburgh, PA 15219, USA

<sup>3</sup> Department of Biochemistry and Molecular Biology, Nippon Medical School, Tokyo 113-0031, Japan

\* Correspondence: bonnier@pitt.edu (B.L.H.); jbc@pitt.edu (J.B.C.)

Received: 12 November 2020; Accepted: 18 November 2020; Published: 21 November 2020



**Abstract:** Oncolytic herpes simplex viruses (oHSV) are under development for the treatment of a variety of human cancers, including breast cancer, a leading cause of cancer mortality among women worldwide. Here we report the design of a fully retargeted oHSV for preferential infection of breast cancer cells through virus recognition of GFR $\alpha$ 1, the cellular receptor for glial cell-derived neurotrophic factor (GDNF). GFR $\alpha$ 1 displays a limited expression profile in normal adult tissue, but is upregulated in a subset of breast cancers. We generated a recombinant HSV expressing a completely retargeted glycoprotein D (gD), the viral attachment/entry protein, that incorporates pre-pro-GDNF in place of the signal peptide and HVEM binding domain of gD and contains a deletion of amino acid 38 to eliminate nectin-1 binding. We show that GFR $\alpha$ 1 is necessary and sufficient for infection by the purified recombinant virus. Moreover, this virus enters and spreads in GFR $\alpha$ 1-positive breast cancer cells in vitro and caused tumor regression upon intratumoral injection in vivo. Given the heterogeneity observed between and within individual breast cancers at the molecular level, these results expand our ability to deliver oHSV to specific tumors and suggest opportunities to enhance drug or viral treatments aimed at other receptors.

**Keywords:** oncolytic; herpes simplex virus; breast cancer

## 1. Introduction

Developing novel therapeutic approaches for the treatment of breast cancer is essential; in 2018, over 600,000 women worldwide died of breast cancer and over 2 million new breast cancer cases were reported [1]. Oncolytic viruses (OV) have been created from a variety of virus species and have been tested in human clinical trials for a broad array of solid tumors, including breast cancer [2–6]. The oncolytic HSV(oHSV) vector Imlygic received U.S. Food and Drug Administration approval in 2015 for treatment of melanoma [7] and clinical trial data demonstrated that Imlygic in conjunction with anti-checkpoint antibodies was even more effective than either therapy alone [8]. Our current understanding of the tumor microenvironment (TME) in both human breast cancer and immune-competent animal models also suggests that immune-modulatory therapeutics are key to OV success [9–12]. The large payload capacity of HSV makes it an excellent candidate for delivery of transgenes to augment the therapeutic potential of the virus [12,13].

Considerable effort has gone into devising strategies to achieve safety and efficacy for oHSV. Vector delivery has largely relied on intratumoral inoculation with off-target replication minimized

by engineered mutations that reduce virulence [14]. An attractive alternative approach is vector retargeting, whereby virus infection is restricted to cells expressing tumor-associated cell surface receptors [15]. By limiting the potential for off-target cell transduction, this approach reduces the need for attenuating mutations. HSV vectors have been completely retargeted to a number of cell surface receptors, including epidermal growth factor receptor (EGFR/EGFRvIII) [16], epithelial cell adhesion molecule (EpCAM) [17], human epidermal growth factor receptor 2 (HER2) [18], and prostate specific membrane antigen (PSMA) [15]. We and others have shown that retargeted viruses can effectively treat tumors in multiple mouse model systems [16,19,20].

The step-wise process of HSV receptor binding and cell entry requires four essential envelope glycoproteins, gD, gB, and the heterodimer gH/gL. Virion gD binds to one of its cellular receptors (nectin-1, herpesvirus entry mediator (HVEM), or 3-O-sulfotransferase modified heparan sulfate), which activates gD through conformational changes that allow it to interact with and activate the gH/gL heterodimer, which in turn activates the fusogenic state of gB [21]. gB then mediates fusion of the viral envelope with the cell surface or endosomal membrane, allowing subsequent entry of the viral capsid into the host cell and trafficking to the nucleus. Retargeting of virus infection involves elimination of the interactions between gD and its cognate receptors, for example by mutation of gD residue 38 to ablate nectin-1 binding and replacement of N-terminal residues comprising the HVEM ligand with a ligand for a tumor-associated target receptor [17,22]. In the present study, we selected the glial cell line-derived neurotrophic factor (GDNF) receptor alpha 1 (GFR $\alpha$ 1) as a target for retargeted oHSV infection. GFR $\alpha$ 1 is a GPI-anchored cell-surface receptor that recognizes both GDNF and neurturin (NTN). Others have previously replaced the amino terminus of HSV-1 glycoprotein C (gC) with pre-pro-(pp)GDNF, removing the signal peptide (SP) and heparan sulfate-binding domain of gC and providing the SP and processing sites of ppGDNF, to favor virus attachment to GFR $\alpha$ 1-expressing neurons [23,24]. While these studies demonstrated the functionality of ppGDNF as an HSV glycoprotein retargeting ligand, gC is dispensable for HSV entry, and, unlike gD retargeting, gC retargeting does not alter virus entry specificity.

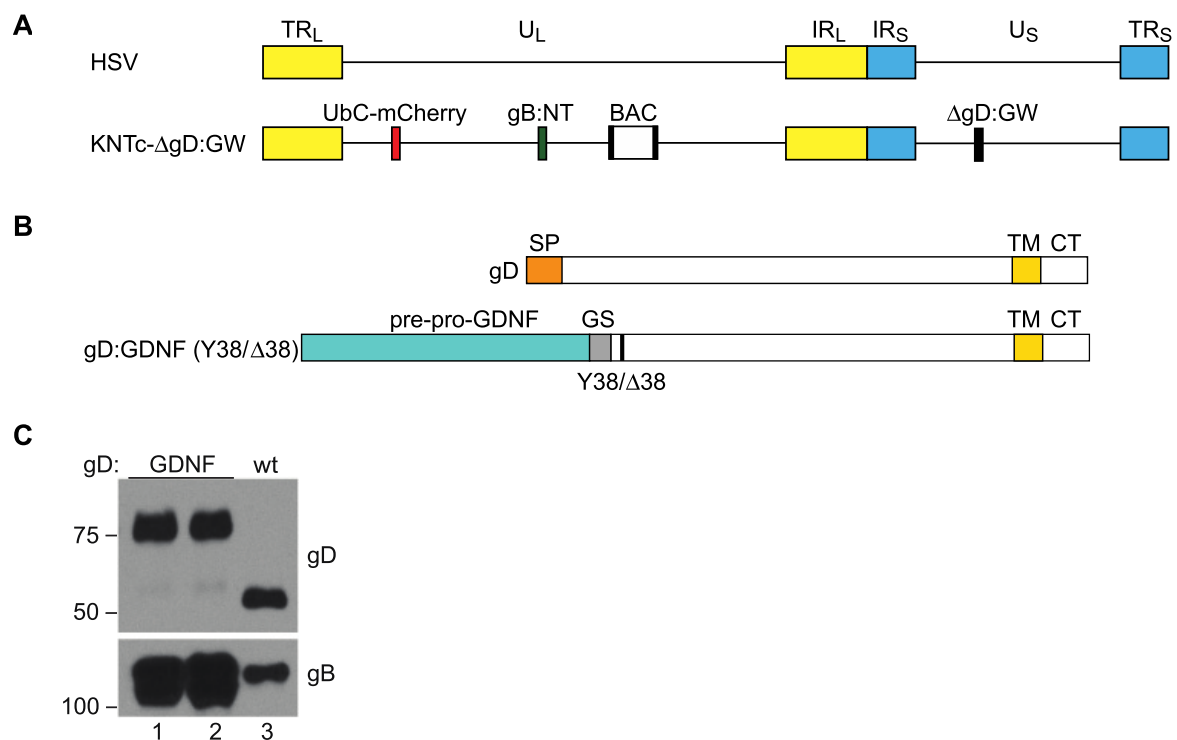
GFR $\alpha$ 1 is expressed at a low or undetectable level in most adult tissues but is expressed highly in breast tumor tissue [25]. In particular, GFR $\alpha$ 1 expression was upregulated compared to normal breast tissue in almost 60% of breast cancer patients sampled and this upregulation was correlated with estrogen receptor (ER)-positive breast cancer cases [26,27]. ER<sup>+</sup> breast cancer cases represent over 75% of all breast cancers and these patients have a long-term risk of death from the disease [28,29]. Breast cancer is a highly heterogeneous group of cancers, exhibiting heterogeneity in morphology and at the molecular level. Breast cancer profiling of gene expression signatures has defined at least four groups of cancer patients with distinct HER2 and hormone receptor (HR: ER and/or progesterone receptor) expression levels: (1) luminal A: HR<sup>+</sup>/HER2<sup>-</sup>, (2) luminal B: HR<sup>+</sup>/HER2<sup>+/+</sup>, (3) HER2-overexpressing: HR<sup>-</sup>/HER2<sup>+</sup>, and (4) basal-like: HR<sup>-</sup>/HER2<sup>-</sup>, generally corresponding to triple negative [30]. Breast cancer-derived cell lines provide models of breast cancer that approximate features of the original tumor subtypes, being similarly grouped by receptor expression as: (1) luminal, (2) HER2<sup>+</sup>, or (3) triple negative [31]. Here, we demonstrate that GFR $\alpha$ 1 is expressed in two luminal cancer cell lines (MCF7, HCC1500) and not in one HER2<sup>+</sup> (MDA-MB-453) and one triple negative (MDA-MB-231) cell line.

Breast cancer treatment with completely retargeted oHSV provides a unique therapeutic approach to deliver robust oHSV vectors to the tumor with limited off-target virus infection that can likely be further restricted by transcriptional and translational control measures [32,33]. While highly promising HER2-retargeted oHSV vectors have been developed [15,18], the molecular heterogeneity observed between and within breast cancer cases underlines the need for a diversity of targeted treatments. In this report we demonstrate that HSV vectors can be completely retargeted for infection via GFR $\alpha$ 1. The GFR $\alpha$ 1-targeted vector efficiently transduced and killed human breast cancer cells bearing the receptor, while cells not expressing the receptor remained uninfected, even at high multiplicity of infection (MOI). Moreover, the retargeted vector induced tumor regression in an MCF7 subcutaneous flank tumor model in nude mice.

## 2. Results

### 2.1. Vector Engineering

All viral backbones generated for this study were based on the HSV-1 genome, strain KOS (Figure 1A), modified to contain loxP-flanked bacterial artificial chromosome (BAC) sequences for genome manipulation in bacteria [34]. The KNTc- $\Delta$ gD:GW backbone [35] (Figure 1A), in addition contained an mCherry reporter gene controlled by the ubiquitin C (UbC) promoter between  $U_L3$  and  $U_L4$  for visualization of infected cells, two mutations in the gB gene previously shown to enhance retargeted virus entry [16,36], and a Gateway (GW) cassette in place of the gD coding sequence for orientation-specific introduction of all tested gD coding sequences.



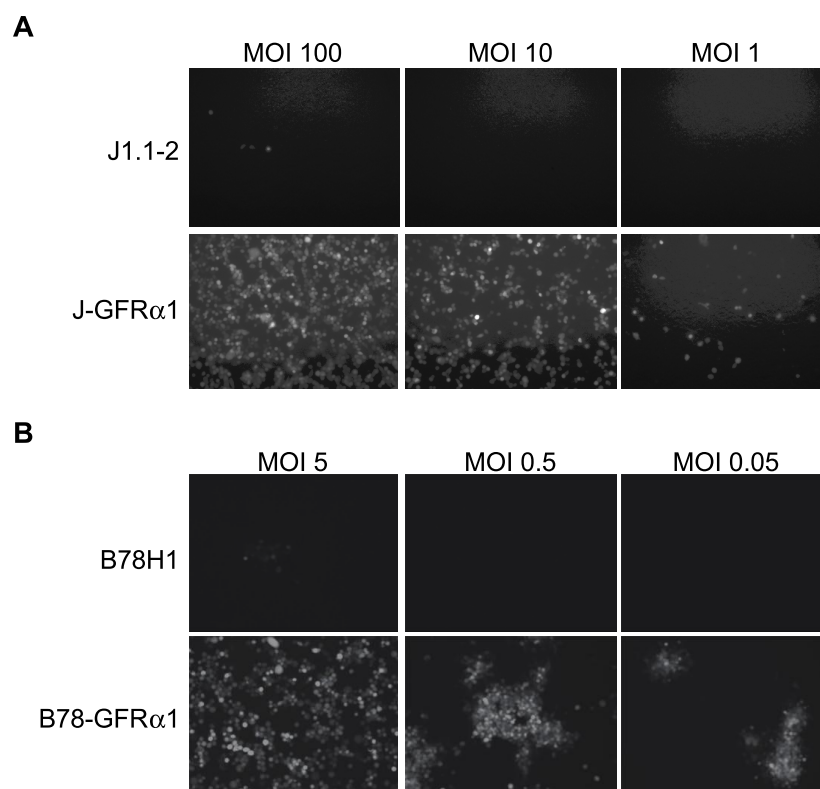
**Figure 1.** Vector engineering. **(A)** Schematic depiction of the herpes simplex virus (HSV) genome. Terminal repeats ( $TR_L$ ,  $TR_S$ ) of the unique long ( $U_L$ ) and unique short ( $U_S$ ) segment, respectively; inverted internal repeats ( $IR_L$ ,  $IR_S$ ) of the unique long ( $U_L$ ) and unique short ( $U_S$ ) segment, respectively. The KNTc- $\Delta$ gD:GW genome represented underneath contains loxP-flanked bacterial artificial chromosome (BAC) sequences, a ubiquitin C (UbC)-promoter driven mCherry cassette (UbC-mCherry), a GW cassette in place of the glycoprotein D (gD) coding sequence ( $\Delta$ gD:GW), and mutations in glycoprotein B that enhance retargeted virus entry (gB:NT) [36]. **(B)** Illustration of wild type gD, depicting the approximate size and location of the signal peptide (SP), transmembrane domain (TM), and cytoplasmic tail (CT), and the recombinant gD proteins gD:GDNF and gD:GDNF $\Delta$ 38; Y38/ $\Delta$ 38 refers to the wild type (wt) gD residue 38 (Y) or the deleted ( $\Delta$ ) residue 38. In both recombinant proteins the pre-pro-GDNF ligand was tethered to the C-terminus of gD at amino acid 25 by a flexible glycine-serine spacer (GS; (G<sub>4</sub>S)  $\times$  3). **(C)** Western blot analysis of gD:wt and gD:GDNF proteins incorporated into purified virus particles.  $1 \times 10^8$  genome copies (gc) of purified virus particles were loaded per lane and blotted with either anti-gD or anti-gB antibodies. Lanes 1 and 2 represent virus stocks from two independent KNTc-gD:GDNF BAC isolates. The virus stock from lane 1 was used for the experiments pictured in Figure 2; the two isolates yielded comparable results.

To target GFR $\alpha$ 1 for virus entry, we genetically replaced the signal peptide and HVEM binding N-terminal domain of gD with ppGDNF to create gD:GDNF, which maintained gD residue Y38

to preserve interaction with the HSV receptor nectin-1 (Figure 1B). Analogous to the previously described GFR $\alpha$ 1-targeted gC [23,24], this design provided the ppGDNF SP and processing sites for N-terminal membrane translocation and exposure of mature GDNF, along with the downstream transmembrane domain (TM) of gD to anchor the protein in the viral envelope or cell membrane. We introduced the gD:GDNF coding sequence into the KNTc- $\Delta$ gD:GW genome via LR clonase reaction in vitro and produced infectious KNTc-gD:GDNF virus by transfection of purified BAC DNA into nectin-1-expressing cells. Western blot analysis revealed the presence of gD:GDNF in purified virus particles as a higher molecular weight protein compared to wild-type (wt) gD (Figure 1C).

## 2.2. The GDNF Ligand Allows GFR $\alpha$ 1-Specific Entry

To assess the ability of purified KNTc-gD:GDNF virus to enter cells solely via interaction with GFR $\alpha$ 1, we derived GFR $\alpha$ 1-expressing cell lines from gD receptor (HVEM, nectin-1)-deficient J1.1-2 and B78H1 cells (Figure S1). After infection of J-GFR $\alpha$ 1 cells at different MOIs, we recorded HSV-mediated mCherry fluorescence at 24 h post infection (hpi). KNTc-gD:GDNF virus was able to enter J-GFR $\alpha$ 1 cells but did not enter parental J1.1-2 cells (Figure 2A). The number of virus-infected cells decreased in a MOI-dependent manner. Likewise, we observed viral reporter gene expression in GFR $\alpha$ 1-transduced B78H1 cells, but not in the parental B78H1 cells (Figure 2B). These data demonstrated GFR $\alpha$ 1-dependent, nectin-1-independent KNTc-gD:GDNF virus entry.



**Figure 2.** Receptor dependence of KNTc-gD:GDNF virus entry. Infection of (A) J1.1-2 and J-GFR $\alpha$ 1 cells or (B) B78H1 and B78-GFR $\alpha$ 1 cells with KNTc-gD:GDNF virus at the indicated multiplicities of infection (MOIs) based on pfu (plaque-forming unit) titers on GFR $\alpha$ 1-transduced U2OS cells (U2OS-ICP4-GFR $\alpha$ 1, Figure S1) (Table 1). Virus entry into cells was visualized at 24 h post infection (hpi) as mCherry fluorescence.

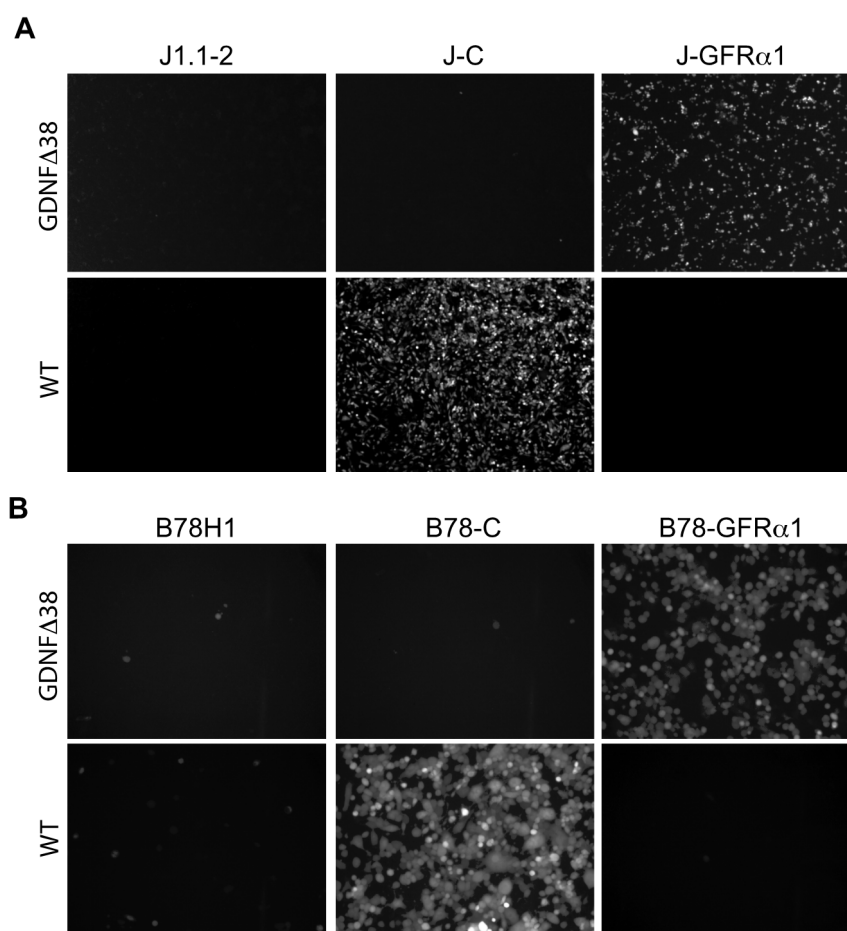
**Table 1.** Viral Titers.

Virus	pfu/mL <sup>1</sup>	gc/mL <sup>2</sup>	gc/pfu Ratio
KNTc-gD:GDNF	$9 \times 10^9$	$1.6 \times 10^{12}$	180
KNTc-gD:GDNF $\Delta$ 38	$2.3 \times 10^8$	$1 \times 10^{12}$	4347
KNTc-gD:wt	$1.9 \times 10^9$	$4.2 \times 10^{11}$	224

<sup>1</sup> Viral titers in pfu/mL on U2OS-ICP4-GFR $\alpha$ 1 cells. <sup>2</sup> Viral titers in genome copies (gc)/mL.

### 2.3. Fully Retargeted Virus Demonstrates GFR $\alpha$ 1-Specific Entry

To generate a nectin-1-detargeted version of the virus, we recombined the gD:GDNF $\Delta$ 38 coding sequence, containing a deletion of gD residue 38 (Figure 1B), into KNTc- $\Delta$ gD:GW BAC DNA and produced the corresponding virus, KNTc-gD:GDNF $\Delta$ 38, by transfection of U2OS-ICP4-GFR $\alpha$ 1 cells (Figure S1). The fully retargeted virus was able to replicate and spread in these cells and high-titer stocks were obtained (Table 1). We compared the receptor specificities of KNTc-gD:GDNF $\Delta$ 38 and KNTc-gD:wt by infection of J1.1-2 and B78H1 cells transduced with the appropriate receptors (Figure 3). At 24 hpi, KNTc-gD:GDNF $\Delta$ 38 showed entry into J-GFR $\alpha$ 1 cells but not into nectin-1-transduced J1.1-2 (J-C) cells, while KNTc-gD:wt virus was able to enter J-C, but not J-GFR $\alpha$ 1 cells (Figure 3A). Similar data were obtained from the comparable panel of B78H1 cells (Figure 3B). These results confirmed that the fully retargeted virus was no longer able to enter cells via the natural gD receptor nectin-1.

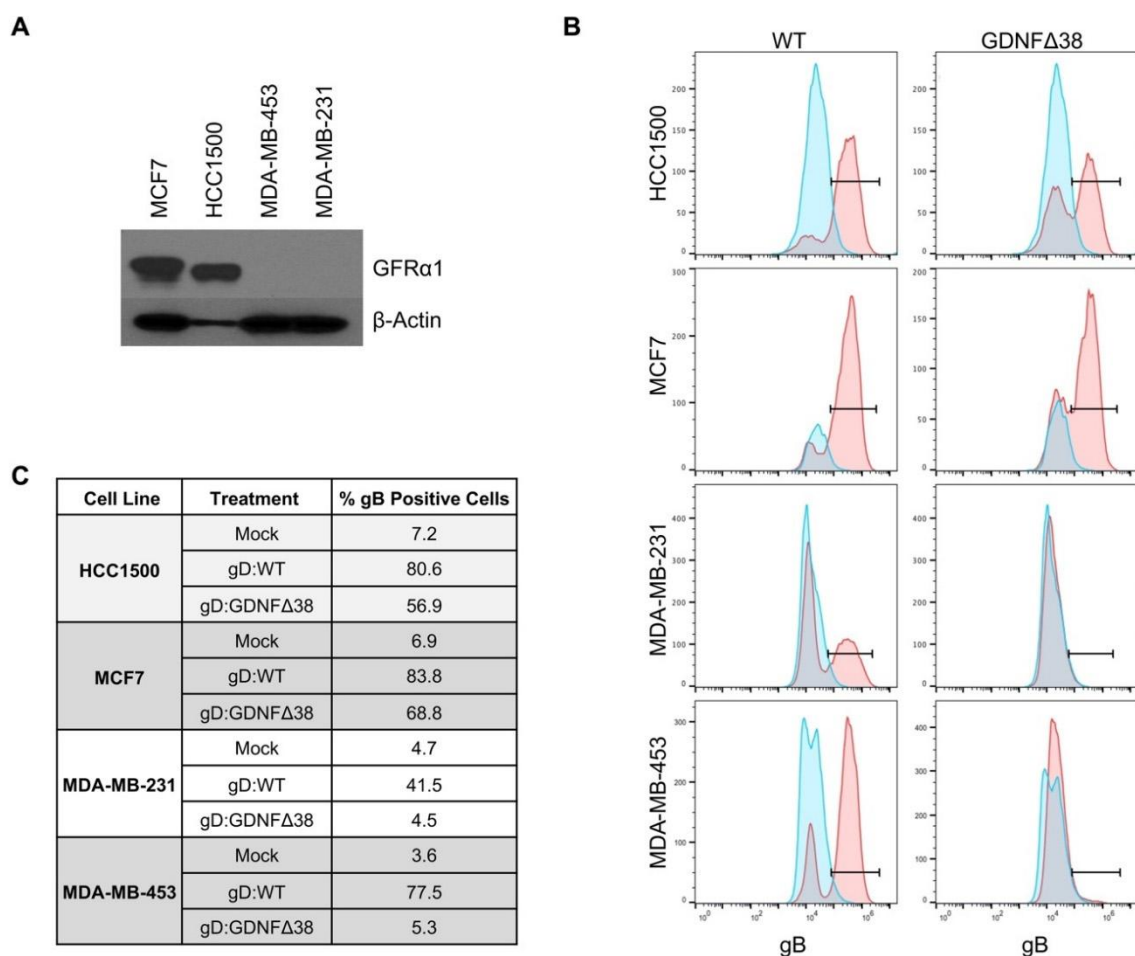


**Figure 3.** Receptor specificity of KNTc-gD:GDNF $\Delta$ 38 virus entry. Infection of (A) J1.1-2, J-C (nectin-1<sup>+</sup>) and J-GFR $\alpha$ 1 cells or (B) B78H1, B78-C and B78-GFR $\alpha$ 1 cells with KNTc-gD:GDNF $\Delta$ 38 and KNTc-gD:wt viruses at 0.5 pfu/cell. Virus entry into cells was visualized as mCherry fluorescence at 24 hpi.



#### 2.4. GFR $\alpha$ 1-Retargeted Virus Infects and Kills Breast Cancer Cells in a GFR $\alpha$ 1-Dependent Manner

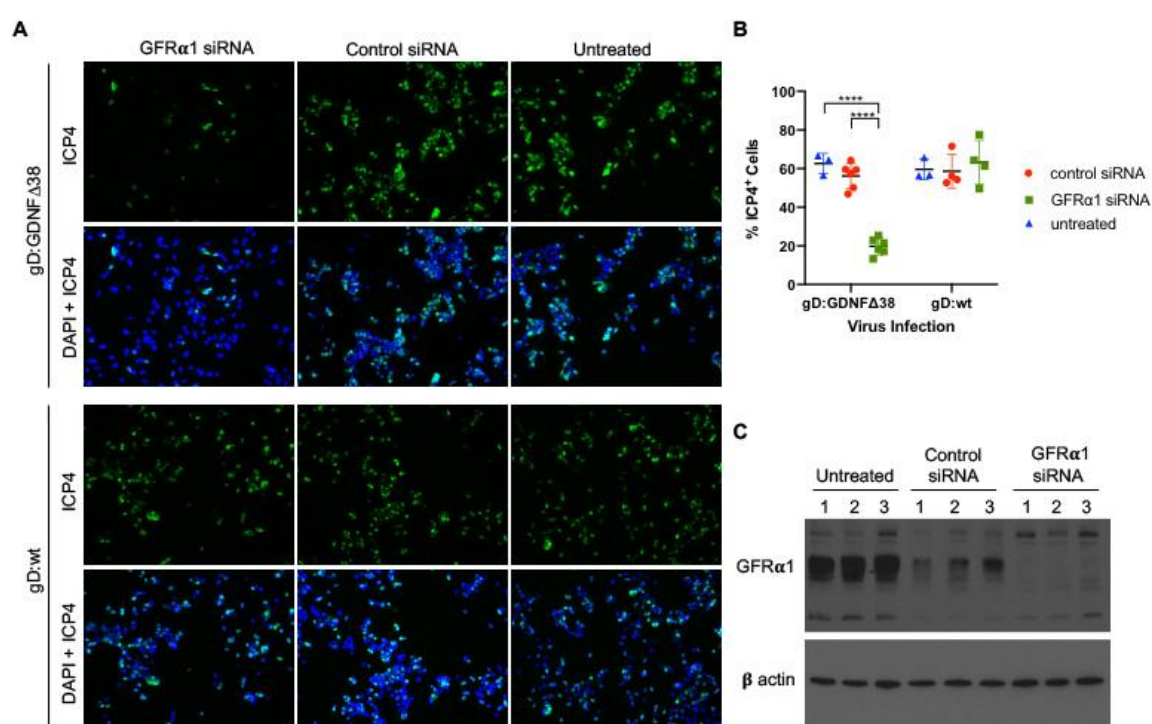
We chose four human breast cancer lines, MCF7, HCC1500, MDA-MB-453, and MDA-MB-231, and assessed GFR $\alpha$ 1 expression by Western blot. HCC1500 and MCF7, both ER<sup>+</sup> [31], expressed detectable levels of GFR $\alpha$ 1 protein, while MDA-MB-231 and MDA-MB453, both ER<sup>-</sup> [31], did not (Figure 4A), consistent with the reported association of ER and GFR $\alpha$ 1 expression in human cancer patients [27]. We infected all four cell lines with KNTc-gD:GDNF $\Delta$ 38 or KNTc-gD:wt virus and assessed infections by flow cytometry for gB, a late ( $\gamma$ 1) viral gene product [37] that is incorporated into the infected cell membrane during viral replication (Figure 4B), and by mCherry visualization of infected cells (Figure S2). These data demonstrated that HCC1500 and MCF7 cells were permissive for both gD:wt and retargeted gD virus entry. Approximately 80% and 84% of HCC1500 and MCF7 cells, respectively, were infected by gD:wt virus, and 57% and 69% were infected by the retargeted virus (Figure 4C). In contrast, while MDA-MB-231 and MDA-MB-453 were infected by gD:wt virus (42% and 78%, respectively), infection by retargeted virus was minimal at best ( $\leq$ 5%, compare to mock).



**Figure 4.** Virus infection of breast cancer cell lines. (A) MCF7, HCC1500, MDA-MB-231, and MDA-MB-453 cell lines were assessed for GFR $\alpha$ 1 expression by Western blot analysis of whole cell lysates;  $\beta$ -actin detection was used as a loading control. (B) HCC1500, MCF7, MDA-MB-231, and MDA-MB-453 cells were infected with KNTc-gD:GDNF $\Delta$ 38 or KNTc-gD:wt virus at 3 pfu/cell and flow cytometry for gB protein on the cell surface was performed at 24 hpi. For each cell line, uninfected cells are shown in blue compared to virus infected cells in red; KNTc-gD:wt infected cells (WT) and KNTc-gD:GDNF $\Delta$ 38 infected cells (GDNF $\Delta$ 38). (C) Quantification of gB<sup>+</sup> cell populations as a percent of the total analyzed cells for each treatment group.

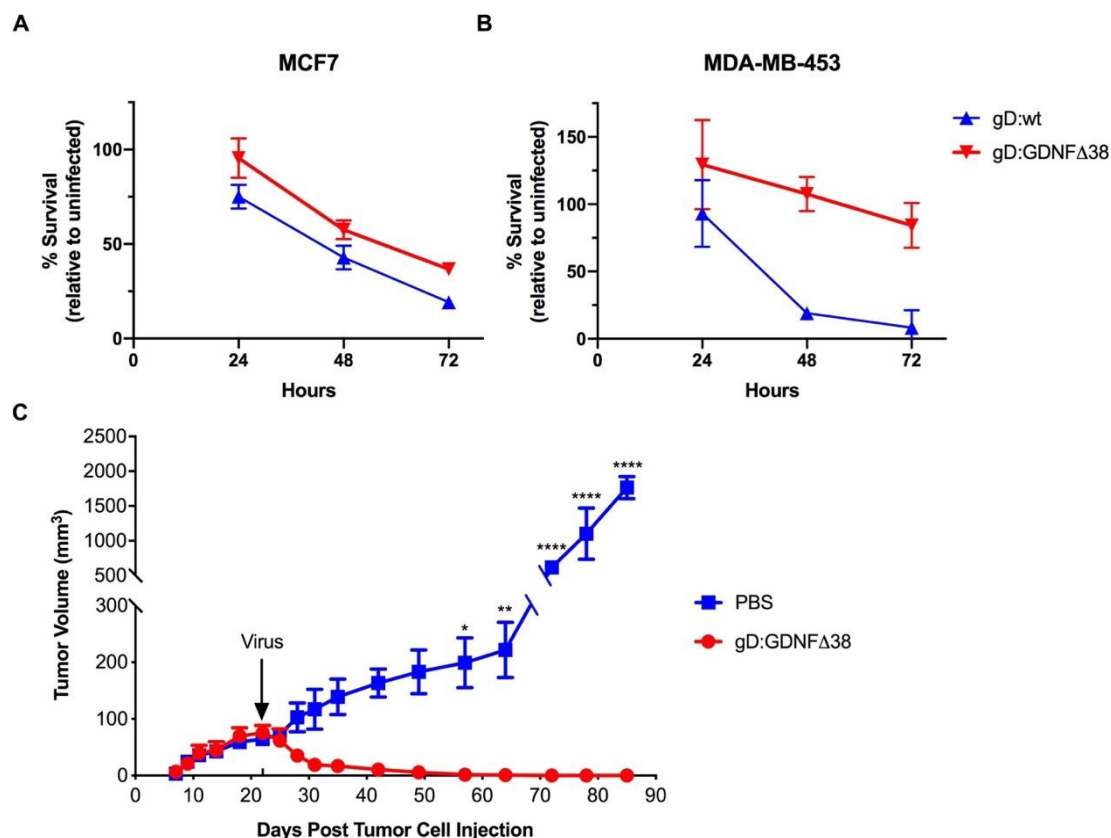


To strengthen the suggestion that GFR $\alpha$ 1 expression is central to efficient retargeted virus infection of breast cancer cells, we transfected MCF7 cells with GFR $\alpha$ 1-specific or non-targeting control short interfering RNA (siRNA) pools, exposed these and uninfected cells at 72 h to KNTc-gD:GDNF $\Delta$ 38 (2 pfu/cell) or KNTc-gD:wt virus (0.2 pfu/cell), and assessed virus entry by staining for the viral immediate-early protein ICP4 at 6 hpi. As indicated by the representative images of Figure 5A and confirmed by the quantitative data of Figure 5B, the specific siRNA pool reduced entry of the gD:GDNF $\Delta$ 38 virus, but not the gD:wt virus, while the control siRNA pool had no pronounced effect on entry by either virus. Western blot analysis at the time of virus infection (Figure 5C) confirmed that the specific siRNA pool dramatically reduced GFR $\alpha$ 1 protein expression compared to untreated cells. The control siRNA pool also reduced GFR $\alpha$ 1 protein levels, although to a lesser extent, but the data indicate that this reduction did not significantly affect entry by either virus. While these results do not fully exclude contributions from other receptors, they are in line with the conclusion that GFR $\alpha$ 1 expression is the key to efficient infection of breast cancer cells by KNTc-gD:GDNF $\Delta$ 38.



**Figure 5.** Virus infection of GFR $\alpha$ 1 siRNA transduced cells. (A) MCF7 cells transfected with GFR $\alpha$ 1-specific or non-specific (“Control”) siRNA pools were infected after 72 h with KNTc-gD:GDNF $\Delta$ 38 (2 pfu/cell) or KNTc-gD:wt (0.2 pfu/cell) and stained at 6 hpi for ICP4 (upper rows) and DAPI (DAPI + ICP4, lower rows); representative images from triplicate infections are shown. (B) Quantification of the ICP4<sup>+</sup> cell populations as a percentage of the total analyzed cells (DAPI) was performed for each treatment group using ImageJ software. Averages represent counts from 3–6 images  $\pm$  SD; statistical differences were determined by two-way ANOVA (\*\*\*\*  $p < 0.0001$ ). (C) Untreated and siRNA-treated MCF7 cells were assessed for GFR $\alpha$ 1 protein expression by Western blot analysis of whole cell lysates; three biological replicates are shown for each condition.  $\beta$ -actin detection was used as loading control.

We next assessed virus-mediated killing of MCF7 and MDA-MB-453 cells using the alamarBlue cell viability assay. The results of a 72-h time course demonstrated that both gD:wt and retargeted virus were cytotoxic for GFR $\alpha$ 1-positive MCF7 cells, resulting in a significant reduction in cell viability over the 72-h time course (Figure 6A). In contrast, only the gD:wt virus was cytotoxic for GFR $\alpha$ 1-negative MDA-MB-453 cells (Figure 6B). These data were consistent with primary dependence of KNTc-gD:GDNF $\Delta$ 38 infection on host-cell GFR $\alpha$ 1 expression.



**Figure 6.** Virus-mediated cell death in vitro and tumor treatment. (A) MCF7 or (B) MDA-MB-453 cells were infected with KNTc-gD:GDNFΔ38 or KNTc-gD:wt virus at 3 pfu/cell and cell viability at 24, 48 and 72 hpi was measured by alamarBlue assay. Data are presented as the percentage of viable cells relative to uninfected cells at each time point. Averages presented at each time point represent 5–8 independent infections ± SEM. Statistics were determined by two-way ANOVA comparing virus infected cells to uninfected control cells at each time point. At 48 and 72 hpi, the viability of MCF7 cells infected with KNTc-gD:wt and KNTc-gD:GDNFΔ38 was significantly reduced compared to uninfected cells (KNTc-gD:wt,  $p < 0.0001$  at 48 and 72 hpi, and KNTc-gD:GDNFΔ38,  $p = 0.0003$  at 48 hpi and  $p < 0.0001$  at 72 hpi). At 72 hpi, the viability of MDA-MB-453 cells infected with KNTc-gD:wt was significantly reduced compared to uninfected cells ( $p < 0.0001$ ). The viability of MDA-MB-453 cells infected with KNTc-gD:GDNFΔ38 was not significantly different from that of uninfected cells at any time point tested. (C) MCF7 cells were implanted in the right hind flank in BALB/c athymic nude mice and tumors were injected with  $1 \times 10^8$  pfu of KNTc-gD:GDNFΔ38 or phosphate-buffered saline (PBS) when reaching a volume of approximately 70 mm<sup>3</sup> (arrow, d22). Average tumor volumes in mm<sup>3</sup> (mean ± SD of 3 animals/group) are presented over time. Statistical differences were determined by two-way ANOVA. KNTc-gD:GDNFΔ38 treated tumors were significantly reduced in volume compared to PBS-injected controls (d57, \*  $p < 0.05$ ; d64, \*\*  $p < 0.01$ ; d72–d85, \*\*\*\*  $p < 0.0001$ ).

### 2.5. GFRα1-Retargeted Virus Induces Tumor Regression in a Nude Mouse Model

We tested the oncolytic activity of the KNTc-gD:GDNFΔ38 virus in a subcutaneous MCF7 flank tumor model in athymic nude mice. At 22 days post cell implantation, established tumors (average volume 70 mm<sup>3</sup>) were injected once with  $1 \times 10^8$  pfu of virus and tumor volumes were recorded every 2–3 days for 85 days. While phosphate-buffered saline (PBS)-treated tumor sizes increased steadily over this time to a final volume of ~2000 mm<sup>3</sup>, virus-treated tumors regressed rapidly and the animals were tumor-free at the end of the observation period (Figure 6C).

### 3. Discussion

HSV-derived oncolytic vectors have been tested in clinical trials for the treatment of solid tumors, including breast cancer [6]. The oHSV Imlygic, currently approved for the treatment of melanoma, was well tolerated in a clinical trial that included 14 metastatic breast cancer patients and reported evidence of tumor cell necrosis [3]. Another HSV-based vector, HF10, was tested in a clinical trial in metastatic breast cancer patients. It too was found to be safe, while demonstrating variable amounts of cancer cell death [4]. The apparent safety of HSV as an oncolytic agent via direct intratumoral injection and the resultant tumor cell killing represent an incentive for further refinement of HSV as a platform for breast cancer oncolytic therapy.

Breast cancer cases are heterogenous, characterized by distinct gene expression profiles, and this heterogeneity defines the course of treatment and patient prognosis. Dependent upon the tumor type, standard of care for breast cancer typically includes one, or a combination, of surgery, chemotherapy, radiation therapy, hormonal therapy, and more recently, targeted-antibody or small-molecule therapy. For example, ER<sup>+</sup> cancers are commonly treated with Selective Estrogen Receptor Modulators (SERMs) or Selective Estrogen Receptor Downregulators (SERDs) that antagonize ER function and are anti-proliferative and apoptotic. However, in over 50% of cases, patients acquire resistance via mechanisms, such as loss of ER expression or alterations in growth factor signaling pathways [38,39]. The cell heterogeneity observed within individual tumors prior to treatment [40,41], and the drift that can occur throughout the course of standard treatment protocols, suggest that complementary or alternative therapies are needed and that a combination of targeted therapies may be more effective than just a single vector or drug. HSV-based, retargeted oncolytic vectors that specifically recognize co-expressed tumor-associated cell-surface proteins provide a unique therapeutic approach to cancer care that can be designed to complement current treatments. HSV-infected cells lyse rapidly, eliminating opportunities to downregulate the targeted receptor.

The receptor tyrosine kinase RET (“REarranged during Transfection”) and its coreceptors of the GDNF family, including GFR $\alpha$ 1, are frequently upregulated in ER<sup>+</sup> breast cancer cases [39]. RET and GFR $\alpha$ 1 are implicated in promoting breast cancer-cell survival, proliferation and migration and *in vitro* data support the involvement of RET signaling pathways in development of drug resistance [27,39,42,43]. Elevated GFR $\alpha$ 1 expression in breast cancer has also been linked to lymph node metastasis and poor prognosis [44]. RET and its coreceptors therefore represent viable therapeutic targets for use in conjunction with current breast cancer therapies, and GFR $\alpha$ 1 has recently been assessed as a target for antibody-drug conjugates [25,45]. In this study, we created an HSV vector that is specifically retargeted to GFR $\alpha$ 1, extending the current repertoire of PSMA-, EpCAM-, EGFR- and HER2-retargeted HSVs [15–18].

Cell lines derived from breast cancer patients can be classified into subtypes based on receptor expression, similar to those identified in patients [46,47]. Of the cell lines we analyzed, MCF7 and HCC1500 cells represent luminal A-type cells (ER<sup>+</sup> and HER2<sup>-</sup>), while MDA-MB-453 are HER2 overexpressing (ER<sup>-</sup> and HER2<sup>+</sup>) and MDA-MB-231 are basal-like (ER<sup>-</sup> and HER2<sup>-</sup>). We confirmed that only the ER<sup>+</sup> MCF7 and HCC1500 cell lines express GFR $\alpha$ 1, raising the expectation that our GFR $\alpha$ 1-specific oHSV will seek out a distinct subtype of breast cancer cells than the previously developed HER2-retargeted oHSVs. Indeed, we demonstrated that the retargeted virus efficiently infected and killed GFR $\alpha$ 1-positive, but not GFR $\alpha$ 1-negative, breast cancer cells *in vitro*, and knockdown of GFR $\alpha$ 1 protein expression significantly reduced retargeted virus infection. Furthermore, we showed that this virus can mediate long-term GFR $\alpha$ 1<sup>+</sup> tumor regression upon intratumoral injection.

Tumor receptor-specific oncolytic viruses could be particularly beneficial if systemic administration results in their preferential localization to both the primary tumor and dispersed metastases. In breast cancer patients, elevated GFR $\alpha$ 1 expression has been linked to tumor lymph-node metastases [27,44,45] and ultimately, the goal of oHSV targeting to GFR $\alpha$ 1-expressing cells is therefore to enable safe and effective system-wide treatment. Thus far, we have not observed preferential homing to MCF7 subcutaneous tumors following intravenous injection of the retargeted virus. Multiple factors may

affect vector delivery via this route. In particular, the genome copy to pfu ratio of our virus stock (Table 1) suggests that a substantial fraction of the particles in this preparation is unable to enter and/or spread within receptor-bearing cells. This may be due to reduced incorporation of the modified gD protein into the viral envelope. As discussed in Tuzmen et al. [35], it is unclear how much gD is required for effective infection, particularly when delivered intravenously. As a potential remedy, our current work seeks to increase retargeted gD incorporation into virions by systematic analysis of rational modifications to its design. If successful, our HSV-based approach to targeted breast cancer therapy will not only single out receptor-expressing cells for oncolysis, but also provide abundant payload capacity to co-deliver transgenes that can augment therapy, such as immune-modulatory genes that counteract the immunosuppressive TME [48].

## 4. Materials and Methods

### 4.1. Cell Lines

MCF7 cells were obtained from Adrian Lee (University of Pittsburgh). MDA-MB-453, HCC1500 and MDA-MB-231 cells were obtained from ATCC (Manassas, VA, USA). HCC1500 cells were cultured in RPMI media (ATCC) supplemented with 10% fetal bovine serum (FBS). MCF7 and MDA-MB-453 cells were cultured in Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM; Corning, Durham, NC) supplemented with 10% FBS. The U2OS-ICP4 cell line [49] was cultured in DMEM supplemented with 10% FBS and 2 µg/mL puromycin (ICP4 selection). Baby hamster kidney J1.1-2 cells were provided by Gabriella Campadelli-Fiume (University of Bologna) and murine melanoma B78H1 cells were provided by Gary Cohen (University of Pennsylvania); both cell lines were cultured in DMEM supplemented with 5% FBS. Nectin-1 transduced J-C cells and B78-C cells were cultured in DMEM supplemented with 5% FBS and antibiotic selection as previously described [50]. J-GFR $\alpha$ 1 and U2OS-ICP4-GFR $\alpha$ 1 stable cell lines were generated by transfection of J1.1-2 cells and U2OS-ICP4 with pCMV6-Kan/neo-GFR $\alpha$ 1 and selection with 400 µg/mL or 700 µg/mL G418, respectively. The B78-GFR $\alpha$ 1 stable cell line was generated by infection of B78H1 cells with GFR $\alpha$ 1 retrovirus and selection with blasticidin (2 µg/mL). Retrovirus production was performed as described [49]. In each case, single clones were isolated, screened by immunofluorescence with anti-GFR $\alpha$ 1 antibody, and positive clones were expanded for this study (Figure S1).

### 4.2. Plasmids

pCMV6-Kan/neo-GFR $\alpha$ 1 was obtained from Origene (Rockville, MD, USA) (MC203605, untagged murine GFR $\alpha$ 1). The cDNA for murine pre-pro-GDNF was obtained from Thermo Scientific (Waltham, MA, USA) (pCR4-GDNF; MMM1013-99829087). To obtain the pCX4-GFR $\alpha$ 1-bsr retroviral plasmid, first a pCX4-GW-bsr plasmid was constructed by insertion of a GW cassette into pCX4-bsr [51] as previously described [49]. We then subcloned the GFR $\alpha$ 1 coding sequence from pCMV6-Kan/neo-GFR $\alpha$ 1 into pENTR1A (Thermo Scientific, Invitrogen) and recombined the GFR $\alpha$ 1 sequence into pCX4-GW-bsr by LR clonase II (Thermo Scientific, Invitrogen) reaction. The pENTR-gD:wt plasmid contains the wild-type (wt) gD coding sequence (strain KOS) between the *att*L1 and *att*L2 recombination sites in pENTR1A. The gD coding sequence from the previously described pgD: $\Delta$ 224/38C plasmid [22] was transferred to pENTR1A and the Y38C point mutation located between BstB1 and BspE1 sites was replaced with the  $\Delta$ 38 mutation as described [35] to generate pENTR-gD: $\Delta$ 224/ $\Delta$ 38; all retargeted gD constructs were derived from this plasmid. In pENTR-gD:GDNF $\Delta$ 38, the N-terminal coding sequence of gD: $\Delta$ 224/ $\Delta$ 38 up to gD codon 25 was replaced with the murine pre-pro-GDNF coding sequence obtained from pCR4-GDNF by PCR with primers GDNFDraIF and GDNFSpeIR (Table 2). To create the pENTR-gD:GDNF construct, a fragment containing codon 38 was amplified from pENTR-gD:wt with primers BstBIY38F and BspEIY38R (Table 2) and cloned between the BstBI and BspEI sites of pENTR-gD:GDNF $\Delta$ 38. All constructs were confirmed by DNA sequencing.



**Table 2.** Primer Sequences.

Primer Name	Primer Sequence
GDNFDraIF	GTCAGATTTAAATGGGATTCGGGCCACTTGGAG
GDNFSpeIR	GTCAGAACTAGTAGAGCCTCCACCT
BstBIY38F	CCAGATCCTCCACCGCACTGCCACCTCCGCCGATACATCCACACCGTTTAGCGG
BspEIY38R	CGGGGGTTCGAAGAGTGTACCACATCCAGGCGGGCCTAC
RED-gD-delF <sup>1</sup>	GTTGTTTCCGGACGTCTTCGGAGGC
RED-gD-delR <sup>1</sup>	CCCCGATCATCAGTTATCCTTAAGGTCTCTTTTGTGTGGTTCGTTCCGGTacc aagttgtacaaaaagctgaac
	CATCCCAACCCCGCAGACCTGACCCCCCGCACCCATTAAGGGGGGGTATacca ctttgtacaagaaagctgaac

<sup>1</sup> gD homology arms are specified in uppercase letters and GW cassette primer binding regions are specified in lowercase letters.

#### 4.3. Viruses

The BAC-containing gD-null viral backbone, KNTc-ΔgD:GW (Figure 1A), was derived from KNTc BAC [49] by Red-mediated replacement of the gD coding sequence with a GW cassette that had been amplified with RED-gD-delF and RED-gD-delR primers (Table 2) targeting the proximal 5' and 3' gD untranslated sequences, essentially as described [35]. Wt and retargeted gD genes were then introduced by LR Clonase II-mediated recombination of the GW cassette with different pENTR-based gD plasmids [52]. Recombinants were confirmed by field inversion gel electrophoresis (FIGE) of restriction digests followed by PCR and DNA sequencing across the gD cassettes. Infectious viruses were produced by transfection of U2OS-ICP4-GFRα1 cells and biological titers were determined by standard plaque assays (Table 1).

#### 4.4. Genome Copy Titers

Viral genome copy (gc) titers were determined essentially as described [49] (Table 1). Briefly, viral DNA was collected using the DNeasy Blood and Tissue Kit (Qiagen, Germantown, MD, USA) and gc numbers were determined by qPCR for the gD gene relative to a standard curve. The portion of the gD gene amplified in this assay corresponded to an unchanged region roughly 100 codons downstream of codon 38.

#### 4.5. Flow Cytometry

$3 \times 10^5$  cells were seeded in a 6-well dish and infected with virus at MOI 3. At 24 hpi, cells were washed with PBS and dispersed with enzyme-free cell dissociation reagent (Thermo Fisher Scientific, Gibco). Cells were fixed in 2% PFA, washed 3 times with FACS buffer (1% BSA in PBS), filtered through a 45-micron filter and stained with primary antibody against gB (Virusys, Taneytown, MD, USA) and anti-mouse Alexa488-labeled secondary antibody (Molecular Probes, Eugene, OR, USA). Fluorescent cells were detected on a BD Accuri C6 flow cytometer (BD Biosciences, San Jose, CA, USA) and data was analyzed with FloJo v10 software (FlowJo LLC, Ashland, OR, USA). Uninfected cells were used as controls.

#### 4.6. Western Blot

Whole cell lysates were collected in 1× RIPA buffer (MilliporeSigma, Burlington, MA, USA) plus protease inhibitor cocktail (MilliporeSigma, Roche) and samples were diluted in 1× Laemmli sample buffer (BioRad, Hercules, CA, USA). Viruses were diluted in 1× Laemmli sample buffer at  $1 \times 10^8$  gc/well. Lysates were heated for 5 min at 100 °C, proteins were separated by polyacrylamide gel electrophoresis and transferred to PVDF membrane. The membrane was blocked for 1 h in 5% nonfat dry milk in PBS + 0.05% Tween and incubated sequentially with primary antibody and horseradish peroxidase-conjugated secondary antibody (anti-mouse IgG; Abcam, Cambridge, UK).

Primary antibodies: gD (DL6) (Santa Cruz, Dallas, TX, USA), gB (Virusys), GFR $\alpha$ 1 (Thermo Fisher Scientific),  $\beta$ -actin (Abcam).

#### 4.7. AlamarBlue Cell Viability Assay

$3 \times 10^3$  cells were seeded in 96-well dishes 24 h prior to infection. Cells were infected at 3 pfu/cell in 60  $\mu$ L serum-free media at 37 °C for 1.5 h and overlaid with 60  $\mu$ L media containing 10% FBS. Wells without cells and uninfected cells were used as controls. At 24, 48, and 72 hpi, 10  $\mu$ L alamarBlue reagent (Thermo Fisher) was added to the cells and the plates were incubated for a further 3–5 h at 37 °C. Supernatants were transferred to opaque-black 96-well dishes and samples were measured for fluorescence by a Biotek (Winooski, VT, USA) plate reader (560 nm excitation/590 nm emission).

#### 4.8. siRNA Transfection

$2 \times 10^4$  cells were seeded in a 48-well dish 24 h prior to transfection. Cells were transfected with siGenome human GFR $\alpha$ 1 SMARTPool siRNA or siGenome non-targeting pool control siRNA (Horizon, Cambridge, UK) using DharmaFECT reagent 1 at a final siRNA concentration of 25 nM. Protein samples for Western blot analysis were collected 72 h post-transfection, and parallel wells were infected in triplicate with KNTc-gD:GDNF $\Delta$ 38 virus at 2 pfu/cell or KNTc-gD:wt virus at 0.2 pfu/cell in 120  $\mu$ L serum-free media for 1.5 h at 37 °C and overlaid with 120  $\mu$ L media containing 10% FBS. At 6 hpi, cells were fixed in 4% paraformaldehyde and cells were stained with mouse primary antibody against ICP4 (Santa Cruz) and Alexa 488-conjugated secondary antibody (Thermo Fisher Scientific); nuclei were stained with DAPI. Images were taken for each infection and stained cells were counted using ImageJ software version 1.52. ICP4-positive cells were counted and calculated as the percentage of DAPI stained total cells.

#### 4.9. Animal Studies

$5 \times 10^6$  MCF7 cells were injected subcutaneously in the right hind flank of six female BALB/c athymic nude mice (Jackson Labs, Bar Harbor, ME, USA). When the tumors reached an average of 70 mm<sup>3</sup> (d22), PBS ( $n = 3$ ) or  $1 \times 10^8$  pfu of KNTc-gD:GDNF $\Delta$ 38 virus ( $n = 3$ ) was injected intratumorally (single dose/animal). Tumors were measured every several days for 85 d by an animal technician who was blinded to the experimental details, and volumes calculated as  $(L \times W^2) \times 0.52$ . If tumor dimension in one orientation exceeded 20 mm, or the tumor volume exceeded 2000 mm<sup>3</sup>, the mice were humanely euthanized. If mice were unable to ambulate, eat, or drink, lost > 10% body weight, or showed a disheveled appearance they were humanely euthanized. If the cell or virus injections induced redness and inflammation at the injection site, topical antibiotic was administered to minimize risk of topical pathogen infection. All animal studies were approved by the University of Pittsburgh Institutional Animal Care and Use Committee (IACUC protocol 19024419) in accordance with the requirements and recommendations in the NIH Guide for the Care and the Use of Laboratory Animals (Institute for Laboratory Animal Research, 1985).

#### 4.10. Statistical Analysis

GraphPad Prism 8 software for MacOS was used for all statistical analyses. Averages for each experiment were calculated  $\pm$  SD or SEM, as indicated in the respective figure legends. Two-way ANOVA analyses were used to determine the statistical significance of differences observed between groups.

**Supplementary Materials:** The following are available online at <http://www.mdpi.com/1422-0067/21/22/8815/s1>.

**Author Contributions:** Conceptualization, B.L.H., J.B.C., J.C.G.; Investigation, B.L.H., D.L., W.F.G.; Analysis, B.L.H., J.B.C.; Resources, Y.M.; Writing—Original Draft Preparation, B.L.H.; Writing—Review & Editing, J.B.C., J.C.G.; Funding Acquisition, J.C.G. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

**Funding:** This work was supported by an Alliance for Cancer Gene Therapy (ACGT, United States) 2018 Investigator’s Award in Cell and Gene Therapy for Cancer Research (J.C.G.), a CHDI Foundation grant (A-3777/A-8790) (J.C.G.), and NIH grant R01 CA175052 (J.C.G.).

**Conflicts of Interest:** J.C.G. is an inventor of intellectual property licensed to Coda Biotherapeutics, Inc. (San Francisco, CA). J.B.C. and J.C.G. are inventors of intellectual property licensed to Oncorus, Inc. (Cambridge, MA, USA). J.C.G. is a consultant and member of the Scientific Advisory Boards of Coda Biotherapeutics, Inc. and Oncorus, Inc. W.F.G. is a consultant of Oncorus, Inc.

## References

- Bray, F.; Ferlay, J.; Soerjomataram, I.; Siegel, R.L.; Torre, L.A.; Jemal, A. Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA Cancer J. Clin.* **2018**, *68*, 394–424. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- Bernstein, V.; Ellard, S.L.; Dent, S.; Tu, D.; Mates, M.; Dhesy-Thind, S.K.; Panasci, L.; Gelmon, K.A.; Salim, M.; Song, X.; et al. A randomized phase II study of weekly paclitaxel with or without pelareorep in patients with metastatic breast cancer: Final analysis of Canadian Cancer Trials Group IND.213. *Breast Cancer Res. Treat.* **2018**, *167*, 485–493. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- Hu, J.C.; Coffin, R.S.; Davis, C.J.; Graham, N.J.; Groves, N.; Guest, P.J.; Harrington, K.; James, N.D.; Love, C.A.; McNeish, I.; et al. A Phase I Study of OncoVEXGM-CSF, a Second-Generation Oncolytic Herpes Simplex Virus Expressing Granulocyte Macrophage Colony-Stimulating Factor. *Clin. Cancer Res.* **2006**, *12*, 6737–6747. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- Kimata, H.; Imai, T.; Kikumori, T.; Teshigahara, O.; Nagasaka, T.; Goshima, F.; Nishiyama, Y.; Nakao, A. Pilot Study of Oncolytic Viral Therapy Using Mutant Herpes Simplex Virus (HF10) Against Recurrent Metastatic Breast Cancer. *Ann. Surg. Oncol.* **2006**, *13*, 1078–1084. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- Nakao, A.; Kimata, H.; Imai, T.; Kikumori, T.; Teshigahara, O.; Nagasaka, T.; Goshima, F.; Nishiyama, Y. Intratumoral injection of herpes simplex virus HF10 in recurrent breast cancer. *Ann. Oncol.* **2004**, *15*, 988–989. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- Eissa, I.R.; Bustos-Villalobos, I.; Ichinose, T.; Matsumura, S.; Naoe, Y.; Miyajima, N.; Morimoto, D.; Mukoyama, N.; Zhiwen, W.; Tanaka, M.; et al. The Current Status and Future Prospects of Oncolytic Viruses in Clinical Trials against Melanoma, Glioma, Pancreatic, and Breast Cancers. *Cancers* **2018**, *10*, 356. [[CrossRef](#)]
- Pol, J.; Kroemer, G.; Galluzzi, L. First oncolytic virus approved for melanoma immunotherapy. *Oncol Immunology* **2016**, *5*, e1115641. [[CrossRef](#)]
- Russell, S.J.; Peng, K.-W. Oncolytic Virotherapy: A Contest between Apples and Oranges. *Mol. Ther.* **2017**, *25*, 1107–1116. [[CrossRef](#)]
- Gatti-Mays, M.E.; Balko, J.M.; Gameiro, S.R.; Bear, H.D.; Prabhakaran, S.; Fukui, J.; Disis, M.L.; Nanda, R.; Gulley, J.L.; Kalinsky, K.; et al. If we build it they will come: Targeting the immune response to breast cancer. *NPJ Breast Cancer* **2019**, *5*, 1–13. [[CrossRef](#)]
- Bates, J.P.; Derakhshandeh, R.; Jones, L.; Webb, T.J. Mechanisms of immune evasion in breast cancer. *BMC Cancer* **2018**, *18*, 556. [[CrossRef](#)]
- Desbois, M.; Béal, C.; Charrier, M.; Besse, B.; Meurice, G.; Cagnard, N.; Jacques, Y.; Béchar, D.; Cassard, L.; Chaput, N. IL-15 superagonist RLI has potent immunostimulatory properties on NK cells: Implications for antimetastatic treatment. *J. Immunother. Cancer* **2020**, *8*, e000632. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- Ghouse, S.M.; Nguyen, H.-M.; Bommareddy, P.K.; Guz-Montgomery, K.; Saha, D. Oncolytic Herpes Simplex Virus Encoding IL12 Controls Triple-Negative Breast Cancer Growth and Metastasis. *Front. Oncol.* **2020**, *10*, 384. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- Thomas, S.; Kuncheria, L.; Roulstone, V.; Kyula, J.N.; Mansfield, D.; Bommareddy, P.K.; Smith, H.; Kaufman, H.L.; Harrington, K.J.; Coffin, R.S. Development of a new fusion-enhanced oncolytic immunotherapy platform based on herpes simplex virus type 1. *J. Immunother. Cancer* **2019**, *7*, 214. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

14. Totsch, S.K.; Schlappi, C.; Kang, K.-D.; Ishizuka, A.S.; Lynn, G.M.; Fox, B.; Beierle, E.A.; Whitley, R.J.; Markert, J.M.; Gillespie, G.Y.; et al. Oncolytic herpes simplex virus immunotherapy for brain tumors: Current pitfalls and emerging strategies to overcome therapeutic resistance. *Oncogene* **2019**, *38*, 6159–6171. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
15. Menotti, L.; Avitabile, E.; Gatta, V.; Malatesta, P.; Petrovic, B.; Campadelli-Fiume, G. HSV as A Platform for the Generation of Retargeted, Armed, and Reporter-Expressing Oncolytic Viruses. *Viruses* **2018**, *10*, 352. [[CrossRef](#)]
16. Uchida, H.; Marzulli, M.; Nakano, K.; Goins, W.F.; Chan, J.; Hong, C.-S.; Mazzacurati, L.; Yoo, J.Y.; Haseley, A.; Nakashima, H.; et al. Effective Treatment of an Orthotopic Xenograft Model of Human Glioblastoma Using an EGFR-retargeted Oncolytic Herpes Simplex Virus. *Mol. Ther.* **2013**, *21*, 561–569. [[CrossRef](#)]
17. Shibata, T.; Uchida, H.; Shiroyama, T.; Okubo, Y.; Suzuki, T.; Ikeda, H.; Yamaguchi, M.; Miyagawa, Y.; Fukuhara, T.; Cohen, J.B.; et al. Development of an oncolytic HSV vector fully retargeted specifically to cellular EpCAM for virus entry and cell-to-cell spread. *Gene Ther.* **2016**, *23*, 479–488. [[CrossRef](#)]
18. Menotti, L.; Cerretani, A.; Hengel, H.; Campadelli-Fiume, G. Construction of a Fully Retargeted Herpes Simplex Virus 1 Recombinant Capable of Entering Cells Solely via Human Epidermal Growth Factor Receptor 2. *J. Virol.* **2008**, *82*, 10153–10161. [[CrossRef](#)]
19. Leoni, V.; Vannini, A.; Gatta, V.; Rambaldi, J.; Sanapo, M.; Barboni, C.; Zaghini, A.; Nanni, P.; Lollini, P.-L.; Casiraghi, C.; et al. A fully-virulent retargeted oncolytic HSV armed with IL-12 elicits local immunity and vaccine therapy towards distant tumors. *PLoS Pathog.* **2018**, *14*, e1007209. [[CrossRef](#)]
20. Nanni, P.; Gatta, V.; Menotti, L.; De Giovanni, C.; Ianzano, M.; Palladini, A.; Grosso, V.; Dall’Ora, M.; Croci, S.; Nicoletti, G.; et al. Preclinical Therapy of Disseminated HER-2<sup>+</sup> Ovarian and Breast Carcinomas with a HER-2-Retargeted Oncolytic Herpesvirus. *PLoS Pathog.* **2013**, *9*, e1003155. [[CrossRef](#)]
21. Hilterbrand, A.T.; Heldwein, E.E. Go go gadget glycoprotein!: HSV-1 draws on its sizeable glycoprotein tool kit to customize its diverse entry routes. *PLoS Pathog.* **2019**, *15*, e1007660. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
22. Uchida, H.; Chan, J.; Shrivastava, I.H.; Reinhart, B.; Grandi, P.; Glorioso, J.C.; Cohen, J.B. Novel Mutations in gB and gH Circumvent the Requirement for Known gD Receptors in Herpes Simplex Virus 1 Entry and Cell-to-Cell Spread. *J. Virol.* **2013**, *87*, 1430–1442. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
23. Cao, H.; Zhang, G.-R.; Wang, X.; Kong, L.; Geller, A.I. Enhanced nigrostriatal neuron-specific, long-term expression by using neural-specific promoters in combination with targeted gene transfer by modified helper virus-free HSV-1 vector particles. *BMC Neurosci.* **2008**, *9*, 37. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
24. Wang, X.; Kong, L.; Zhang, G.-R.; Sun, M.; Geller, A.I. Targeted gene transfer to nigrostriatal neurons in the rat brain by helper virus-free HSV-1 vector particles that contain either a chimeric HSV-1 glycoprotein C-GDNF or a gC-BDNF protein. *Mol. Brain Res.* **2005**, *139*, 88–102. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
25. Bosco, E.E.; Christie, R.J.; Carrasco, R.; Sabol, D.; Zha, J.; Dacosta, K.; Brown, L.; Kennedy, M.; Meekin, J.; Phipps, S.; et al. Preclinical evaluation of a GFRA1 targeted antibody-drug conjugate in breast cancer. *Oncotarget* **2018**, *9*, 22960–22975. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
26. Essegir, S.; Kennedy, A.; James, M.; O’Hare, M.; Jeffery, R.; Poulson, R.; Isacke, C.M.; Reis-Filho, J. Identification of transmembrane proteins as potential prognostic markers and therapeutic targets in breast cancer by a screen for signal sequence encoding transcripts. *J. Pathol.* **2006**, *210*, 420–430. [[CrossRef](#)]
27. Essegir, S.; Todd, S.K.; Hunt, T.; Poulson, R.; Plaza-Menacho, I.; Reis-Filho, J.S.; Isacke, C.M. A Role for Glial Cell Derived Neurotrophic Factor Induced Expression by Inflammatory Cytokines and RET/GFR 1 Receptor Up-regulation in Breast Cancer. *Cancer Res.* **2007**, *67*, 11732–11741. [[CrossRef](#)]
28. Jatoi, I.; Chen, B.E.; Anderson, W.F.; Rosenberg, P.S. Breast Cancer Mortality Trends in the United States According to Estrogen Receptor Status and Age at Diagnosis. *J. Clin. Oncol.* **2007**, *25*, 1683–1690. [[CrossRef](#)]
29. Yu, K.-D.; Wu, J.; Shen, Z.-Z.; Shao, Z.-M. Hazard of Breast Cancer-Specific Mortality among Women with Estrogen Receptor-Positive Breast Cancer after Five Years from Diagnosis: Implication for Extended Endocrine Therapy. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* **2012**, *97*, E2201–E2209. [[CrossRef](#)]
30. Howlander, N.; Altekruse, S.F.; Li, C.I.; Chen, V.W.; Clarke, C.A.; Ries, L.A.G.; Cronin, K.A. US Incidence of Breast Cancer Subtypes Defined by Joint Hormone Receptor and HER2 Status. *J. Natl. Cancer Inst.* **2014**, *106*, 5. [[CrossRef](#)]
31. Kao, J.; Salari, K.; Bocanegra, M.; Choi, Y.-L.; Girard, L.; Gandhi, J.; Kwei, K.A.; Hernandez-Boussard, T.; Wang, P.; Gazdar, A.F.; et al. Molecular Profiling of Breast Cancer Cell Lines Defines Relevant Tumor Models and Provides a Resource for Cancer Gene Discovery. *PLoS ONE* **2009**, *4*, e6146. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]



32. Mazzacurati, L.; Marzulli, M.; Reinhart, B.; Miyagawa, Y.; Uchida, H.; Goins, W.F.; Li, A.; Kaur, B.; Caligiuri, M.; Cripe, T.; et al. Use of miRNA Response Sequences to Block Off-target Replication and Increase the Safety of an Unattenuated, Glioblastoma-targeted Oncolytic HSV. *Mol. Ther.* **2015**, *23*, 99–107. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
33. Sasso, E.; Froehlich, G.; Cotugno, G.; D'Alise, A.M.; Gentile, C.; Bignone, V.; De Lucia, M.; Petrovic, B.; Campadelli-Fiume, G.; Scarselli, E.; et al. Replicative conditioning of Herpes simplex type 1 virus by Survivin promoter, combined to ERBB2 retargeting, improves tumour cell-restricted oncolysis. *Sci. Rep.* **2020**, *10*, 4307–4312. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
34. Gierasch, W.W.; Zimmerman, D.L.; Ward, S.L.; Vanheyningen, T.K.; Romine, J.D.; Leib, D.A. Construction and characterization of bacterial artificial chromosomes containing HSV-1 strains 17 and KOS. *J. Virol. Methods* **2006**, *135*, 197–206. [[CrossRef](#)]
35. Tuzmen, C.; Cairns, T.M.; Atanasiu, D.; Lou, H.; Saw, W.T.; Hall, B.L.; Cohen, J.B.; Cohen, G.H.; Glorioso, J.C. Point Mutations in Retargeted gD Eliminate the Sensitivity of EGFR/EGFRvIII-Targeted HSV to Key Neutralizing Antibodies. *Mol. Ther. Methods Clin. Dev.* **2020**, *16*, 145–154. [[CrossRef](#)]
36. Uchida, H.; Chan, J.; Goins, W.F.; Grandi, P.; Kumagai, I.; Cohen, J.B.; Glorioso, J.C. A Double Mutation in Glycoprotein gB Compensates for Ineffective gD-Dependent Initiation of Herpes Simplex Virus Type 1 Infection. *J. Virol.* **2010**, *84*, 12200–12209. [[CrossRef](#)]
37. Birkenheuer, C.H.; Baines, J.D. RNA Polymerase II Promoter-Proximal Pausing and Release to Elongation Are Key Steps Regulating Herpes Simplex Virus 1 Transcription. *J. Virol.* **2019**, *94*, 5. [[CrossRef](#)]
38. Salvati, A.; Gigantino, V.; Nassa, G.; Cappa, V.M.; Ventola, G.M.M.; Cracas, D.G.C.; Mastrocinque, R.; Rizzo, F.; Tarallo, R.; Weisz, A.; et al. Global View of Candidate Therapeutic Target Genes in Hormone-Responsive Breast Cancer. *Int. J. Mol. Sci.* **2020**, *21*, 4068. [[CrossRef](#)]
39. Morandi, A.; Plaza-Menacho, I.; Isacke, C.M. RET in breast cancer: Functional and therapeutic implications. *Trends Mol. Med.* **2011**, *17*, 149–157. [[CrossRef](#)]
40. Turashvili, G.; Brogi, E. Tumor Heterogeneity in Breast Cancer. *Front. Med.* **2017**, *4*, 227. [[CrossRef](#)]
41. Aleskandarany, M.A.; Vandenberghe, M.E.; Marchiò, C.; Ellis, I.O.; Trevisan, M.; Rakha, E.A. Tumour Heterogeneity of Breast Cancer: From Morphology to Personalised Medicine. *Pathobiology* **2018**, *85*, 23–34. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
42. Plaza-Menacho, I.; Morandi, A.; Robertson, D.; Pancholi, S.; Drury, S.; Dowsett, M.; Martin, L.-A.; Isacke, C.M. Targeting the receptor tyrosine kinase RET sensitizes breast cancer cells to tamoxifen treatment and reveals a role for RET in endocrine resistance. *Oncogene* **2010**, *29*, 4648–4657. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
43. Morandi, A.; Martin, L.-A.; Gao, Q.; Pancholi, S.; Mackay, A.; Robertson, D.; Zvelebil, M.; Dowsett, M.; Plaza-Menacho, I.; Isacke, C.M. GDNF-RET Signaling in ER-Positive Breast Cancers Is a Key Determinant of Response and Resistance to Aromatase Inhibitors. *Cancer Res.* **2013**, *73*, 3783–3795. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
44. Wu, Z.S.; Pandey, V.; Wu, W.Y.; Ye, S.; Zhu, T.; Lobie, P.E. Prognostic significance of the expression of GFRalpha1, GFRalpha3 and syndecan-3, proteins binding ARTEMIS, in mammary carcinoma. *BMC Cancer* **2013**, *13*, 34. [[CrossRef](#)]
45. Bhakta, S.; Crocker, L.M.; Chen, Y.; Hazen, M.; Schutten, M.M.; Li, D.; Kuijl, C.P.; Ohri, R.; Zhong, F.; Poon, K.A.; et al. An Anti-GDNF Family Receptor Alpha 1 (GFRA1) Antibody-Drug Conjugate for the Treatment of Hormone Receptor-Positive Breast Cancer. *Mol. Cancer Ther.* **2017**, *17*, 638–649. [[CrossRef](#)]
46. Dai, X.; Cheng, H.; Bai, Z.; Li, J. Breast Cancer Cell Line Classification and Its Relevance with Breast Tumor Subtyping. *J. Cancer* **2017**, *8*, 3131–3141. [[CrossRef](#)]
47. Holliday, D.L.; Speirs, V. Choosing the right cell line for breast cancer research. *Breast Cancer Res.* **2011**, *13*, 1–7. [[CrossRef](#)]
48. Alessandrini, F.; Menotti, L.; Avitabile, E.; Appolloni, I.; Ceresa, D.; Marubbi, D.; Campadelli-Fiume, G.; Malatesta, P. Eradication of glioblastoma by immuno-virotherapy with a retargeted oncolytic HSV in a preclinical model. *Oncogene* **2019**, *38*, 4467–4479. [[CrossRef](#)]
49. Miyagawa, Y.; Marino, P.; Verlengia, G.; Uchida, H.; Goins, W.F.; Yokota, S.; Geller, D.A.; Yoshida, O.; Mester, J.; Cohen, J.B.; et al. Herpes simplex viral-vector design for efficient transduction of nonneuronal cells without cytotoxicity. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2015**, *112*, E1632–E1641. [[CrossRef](#)]
50. Uchida, H.; Shah, W.A.; Ozuer, A.; Frampton, A.R.; Goins, W.F.; Grandi, P.; Cohen, J.B.; Glorioso, J.C. Generation of Herpesvirus Entry Mediator (HVEM)-Restricted Herpes Simplex Virus Type 1 Mutant Viruses: Resistance of HVEM-Expressing Cells and Identification of Mutations That Rescue Nectin-1 Recognition. *J. Virol.* **2009**, *83*, 2951–2961. [[CrossRef](#)]

51. Akagi, T.; Sasai, K.; Hanafusa, H. Refractory nature of normal human diploid fibroblasts with respect to oncogene-mediated transformation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2003**, *100*, 13567–13572. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
52. Reinhart, B.; Goins, W.F.; Harel, A.; Chaudhry, S.; Goss, J.R.; Yoshimura, N.; De Groat, W.C.; Cohen, J.B.; Glorioso, J.C. An HSV-based library screen identifies PP1 $\alpha$  as a negative TRPV1 regulator with analgesic activity in models of pain. *Mol. Ther. Methods Clin. Dev.* **2016**, *3*, 16040. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

**Publisher’s Note:** MDPI stays neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



© 2020 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 (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).