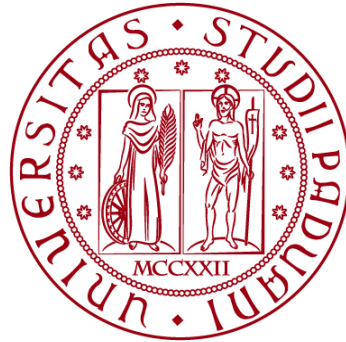


UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI PADOVA

DIPARTIMENTO DI BIOLOGIA

Corso di Laurea in Biotecnologie



ELABORATO DI LAUREA

**SVILUPPO DI STRATEGIE PER LA
SOMMINISTRAZIONE SISTEMICA DI
VIRUS ONCOLITICI**

**Tutor: Prof.ssa Arianna Calistri
Dipartimento di Medicina Molecolare**

Laureanda: Elena Marchetto

ANNO ACCADEMICO 2022/2023

Indice

1. Abstract	
2. Introduzione.....	1
2.1 Tumori e cancro alla prostata (PC).....	1
2.2 Virus oncolitici come agenti antitumorali.....	1
2.3 Storia della terapia virale oncolitica.....	2
2.4 Nuove aspirazioni.....	3
2.5 Scopo dello studio.....	4
3. Materiali e Metodi.....	5
3.1 Analisi in vitro	5
3.1.1 Linee cellulari	5
3.1.2 Ceppo virale e Plasmide.....	6
3.1.3 Produzione e purificazione di liposomi	6
3.1.4 Microscopio elettronico a trasmissione	8
3.1.5 Analisi di Dynamic Light Scattering (DLS).....	8
3.1.6 Saggio MTT	8
3.1.7 Citometria a flusso	9
3.1.8 Reazioni linfocitarie miste e Cytokine bead array (CBA).....	9
3.2 Analisi in vivo	10
3.2.1 Modello di xenotrapianto prostatico ortotopico murino.....	10
3.2.2 Istologia e chimica clinica.....	10
4. Risultati.....	11
4.1 Sintesi di liposomi rivestiti da CCL2 e contenenti l'Ad[I/PPT-E1A]... 11	
4.2 Assorbimento preferenziale dei liposomi rivestiti di CCL2 da parte dei monociti circolanti.....	12
4.3 Lisi delle cellule tumorali prostatiche da parte dell'Ad-HRE-E1A LP 12	
4.4 Il plasmide E1A/B regolato da HRE è essenziale per il corretto funzionamento dell'Ad[I/PPT-E1A].....	12
4.5 Efficacia dell'azione dell'Ad-HRE-E1A LP contro i tessuti neoplastici	13
5. Discussione.....	15
5.1 Il delivery sistemico dei virus oncolitici	15
5.2 Impiego di cellule <i>carrier</i>	15
5.3 TAM	16

5.4 Altre varietà di cellule <i>carrier</i>	17
5.5 Delivery sistemico dell'OV assistito da liposomi	17
5.6 Considerazioni finali	18
6. Bibliografia	21

1. Abstract

L'utilizzo di virus oncolitici (OVs) rappresenta un approccio clinico davvero promettente per la cura di tumori inaccessibili, difficili da trattare tramite le terapie convenzionali, e magari anche presenti in uno stato metastatizzato. Questi agenti biologici, infatti, non solo provocano l'uccisione selettiva delle cellule tumorali, ma stimolano pure l'attività del sistema immunitario e possono inoltre veicolare geni terapeutici.

Tuttavia, nel campo della viroterapia oncolitica rappresenta ancora una grande sfida riuscire a veicolare a livello endovenoso tali agenti immunoterapici, a causa della clearance che essi subiscono, quando presenti nel flusso ematico, da parte dei sistemi di difesa dell'organismo.

L'articolo "Targeting circulating monocytes with CCL2-loaded liposomes armed with an oncolytic adenovirus" (Iscaro et al., 2022), esaminato nell'elaborato in oggetto, propone come metodo innovativo per il delivery sistemico degli OVs l'incapsulamento di un adenovirus oncolitico in liposomi rivestiti da CCL2, combinato all'utilizzo di cellule *carrier* quali i monociti richiamati verso il microambiente tumorale.

Tale trattamento medico comporta un'effettiva diminuzione del numero di metastasi e delle dimensioni della massa tumorale in modelli murini affetti da tumore alla prostata e, in più, permette di bypassare la coltura ex-vivo di monociti, dimostrandosi quindi davvero efficace come sistema di consegna sistemica degli OVs.

2. Introduzione

2.1 Tumori e cancro alla prostata (PC)

Il termine “neoplasia” deriva dal greco e letteralmente significa “nuova formazione”: si tratta di una massa anomala data dalla proliferazione incontrollata di un determinato tessuto, frutto dell’acquisizione di un’alterazione genetica stabilmente trasmessa dalla cellula madre alle cellule figlie, la quale rende spiegazione del ciclo cellulare sovvertito, e in particolar modo accelerato, caratterizzante le neoplasie. Nonostante l’origine di un tumore sia monoclonale, la popolazione neoplastica è data da un insieme di cellule tutte diverse tra loro (si parla nello specifico di “eterogeneità tumorale”): la compresenza di caratteristiche fenotipiche ineguali all’interno dello stesso pool cellulare tumorale è il risultato dell’accumulo, nel corso del tempo e nelle diverse generazioni cellulari, di numerose mutazioni, tali da rendere il DNA particolarmente instabile. Le continue lesioni genetiche che si sommano una ad una nel genoma aumentano la probabilità che le cellule tumorali riescano a invadere i tessuti confinanti, a entrare nel circolo sanguigno o linfatico e, in ultima istanza, a localizzarsi in nuove sedi anatomiche; quando la neoplasia acquisisce queste capacità di invasione e metastatizzazione viene classificata come “maligna” (o, più semplicemente, “cancro”). Il cancro alla prostata (PC), nello specifico, è uno dei tumori più diffusi, soprattutto nel mondo occidentale, rappresentando la quinta causa di morte per tumore nelle persone di sesso maschile, le cui caratteristiche più salienti sono: incidenza che cresce all’aumentare dell’età biologica, capacità di metastatizzare (coinvolgendo, quindi, anche ossa, polmoni, linfonodi e fegato), curabile oggi soltanto nelle prime fasi della malattia, quando il tumore risulta confinato alla sola ghiandola prostatica, attraverso approcci clinici con non pochi effetti collaterali associati, e non sempre garanti il successo terapeutico (Iscaro et al., 2022).

Per queste numerose motivazioni, rappresenta un obiettivo fondamentale lo studio e la successiva messa a punto di nuove tipologie di cure contro il cancro, al fine di accrescere le aspettative di vita dei pazienti oncologici e di migliorarne la qualità di vita.

2.2 Virus oncolitici come agenti antitumorali

La ricerca per lo sviluppo di nuove terapie antitumorali è un settore in continua espansione: oltre ai classici approcci clinici quali l’asportazione chirurgica, la chemioterapia o la radioterapia, nella pratica oncologica attualmente si aspira a sviluppare tecniche sempre più innovative e allo stesso tempo efficaci, basandosi sul pieno sfruttamento delle nozioni acquisite nel corso della storia in molteplici campi scientifici, tra cui sicuramente rientra la microbiologia: la conoscenza circa l’esistenza di virus oncolitici (OVs) e l’apprendimento dei loro meccanismi di d’azione ha portato negli ultimi anni la viroterapia oncolitica a emergere sempre di più, diventando una delle frontiere più promettenti per la cura del cancro,

soprattutto per i pazienti oncologici non responsivi alle terapie convenzionali. Tali microrganismi sono in grado non solo di replicarsi e, in questo senso, distruggere le cellule cancerose, ma anche di stimolare contemporaneamente l'attività del sistema immunitario nello sconfiggere la neoplasia (si parla nello specifico di "immunoterapia oncologica", diretta sia contro il tumore primitivo, che contro le masse metastatiche). Il tumore, per l'appunto, spesso acquisisce nel corso della progressione tumorale particolari caratteristiche tali da garantire un'efficace elusione dei meccanismi di difesa biologici dell'organismo; nonostante ciò, gli antigeni tumorali, molecole rilasciate in seguito a lisi cellulare, ma presenti pure sulla superficie esterna delle cellule neoplastiche non infette, consentono comunque ai linfociti T citotossici di bersagliare e abbattere in modo specifico la massa tumorale (Howells et al., 2017). La possibilità, poi, di poter modificare, sfruttando le tecniche di ingegneria genetica, il genoma di tali virus permette in primis di migliorarne i profili di sicurezza, affinché l'azione litica di tali agenti sia selettivamente ristretta alle sole cellule tumorali e preservi invece i tessuti sani adiacenti, e in aggiunta di potenziarne la capacità di induzione della risposta immunitaria, al fine di creare un'immunità sistemica tumore-specifica solida e prolungata nel tempo (Howells et al., 2017). Se i virus oncolitici geneticamente ingegnerizzati vengono utilizzati anche come vettori per la consegna di geni terapeutici alle cellule infettate (ad esempio, geni antitumorali), il loro sfruttamento viene esteso alla terapia genica e in questo modo massimizzato, tale da renderli un'opzione terapeutica veramente attraente.

2.3 Storia della terapia virale oncolitica

La prima evidenza che ha portato a concepire i virus oncolitici come plausibile strumento terapeutico risale ai primi anni del ventesimo secolo, quando si era osservata una connessione diretta tra regressione tumorale e infezione virale: nel 1904, in un paziente affetto da leucemia mieloide cronica, viene documentata per la prima volta una riduzione delle dimensioni della massa tumorale in seguito ad esposizione del soggetto a virus (Hamid et al., 2017). L'ipotesi che il ciclo replicativo virale renda più vulnerabili le cellule neoplastiche ha portato, negli anni successivi, alla nascita della viroterapia oncolitica, dando il via a molteplici trial, che però non hanno condotto a risultati incoraggianti, essendo che al tempo non esistevano ancora gli strumenti per riuscire a manipolare adeguatamente il genoma del virus in modo da attenuarne la patogenicità, controllarne il tropismo e ridurre gli effetti collaterali indotti dall'agente stesso (Howells et al., 2017). Successivamente, però, grazie alla moderna tecnica del DNA ricombinante, è stato possibile raggiungere i primi traguardi attesi nel campo dell'immunoterapia oncolitica: un grande successo, infatti, è rappresentato dallo sviluppo del Talimogene Laherparepvec (T-VEC o IMLYGIC™), unico OV attualmente approvato dalla Food and Drug Administration degli Stati Uniti, dall'Agenzia Europea per i Medicinali e dall'Australian Therapeutic Goods Administration per il trattamento clinico del melanoma non resecabile. Si tratta, in particolare, di un

HSV-1 geneticamente modificato che esprime GM-CSF (fattore stimolante le colonie dei granulociti-macrofagi), in grado di uccidere esclusivamente le cellule tumorali quando iniettato localmente all'interno della lesione neoplastica, e di favorire allo stesso tempo il reclutamento chemiotattico, la proliferazione e la successiva attivazione di gran parte delle cellule del sistema immunitario (Hamid et al., 2017).

2.4 Nuove aspirazioni

Attualmente, molti virus oncolitici (tra cui, in particolare, herpes simplex virus, adenovirus e reovirus) sono nella fase di trial clinico per la realizzazione di strategie terapeutiche che rappresentino il giusto compromesso tra distruzione tumorale e sicurezza biologica. Sono state ideate negli ultimi anni nuove tattiche per ridurre la massa tumorale, che si basano su meccanismi d'azione anche diversi rispetto alla lisi cellulare e alla stimolazione della risposta immunitaria in risposta al rilascio di antigeni neoplastici. Un'opportunità innovativa è l'uccisione delle cellule tumorali tramite un tipo di morte cellulare conosciuta come "apoptosi", nel caso in cui il genoma virale presenti sequenze codificanti proteine pro-apoptotiche; oppure, ancora, la facoltà del virus di targettare cellule diverse da quelle che costituiscono il pool proliferativo neoplastico: se, ad esempio, il bersaglio molecolare è rappresentato dai neovasi sanguigni del parenchima tumorale (formati durante un processo denominato "angiogenesi"), viene rallentata la perfusione del tessuto canceroso, con conseguente diminuzione dell'apporto di ossigeno e nutrienti, necessari alla crescita neoplastica, e successiva necrosi (Bell, 2012). Nonostante questi progressi, non mancano le nuove sfide che la viroterapia oncolitica continua a porsi, come la possibilità di somministrare l'OV direttamente in endovena. A differenza di un'azione locale (come avviene nel caso in cui l'iniezione del virus oncolitico sia intratumorale), la presenza dell'agente terapeutico direttamente nel circolo ematico assicurerebbe una biodisponibilità così elevata da assicurare una sufficiente concentrazione di OV al sito tumorale, essendo la massa neoplastica vascolarizzata; ciò potrebbe risolvere numerose criticità, quali la capacità di colpire tumori non facilmente accessibili, metastatizzati o non responsivi alla radioterapia e/o chemioterapia (Bell, 2012). Ad oggi, purtroppo, rimane un problema ancora parzialmente irrisolto il raggiungimento di adeguati titoli ematici di OV per garantire l'efficacia del trattamento terapeutico. I motivi che chiariscono la graduale diminuzione del numero di virus libero nel sangue sono l'inevitabile degradazione dell'agente biologico (la cui entità dipende dall'emivita della particella virale), l'adesione aspecifica dello stesso alla superficie di cellule diverse da quelle target, la neutralizzazione mediata da anticorpi circolanti o dal sistema del complemento, oppure, ancora, la rimozione ad opera di organi come fegato e polmoni (Harrington et al., 2002). È a causa di questi molteplici fenomeni (rappresentati in Figura 1 A) che, rispetto alla dose iniziale somministrata, solo una piccola percentuale di OV è in grado di raggiungere effettivamente il bersaglio molecolare e innescare così quella serie di reazioni a cascata che conducono alla risposta biologica attesa. Una

plausibile soluzione per evitare questa clearance è l'impiego di cellule *carrier* (Figura 1 B), ovvero di “cavalli di Troia” in grado di racchiudere il virus oncolitico e proteggerlo dalle minacce esterne, aumentandone così la stabilità. Scegliendo un tipo di cellula con un tropismo specifico per la massa neoplastica, è inoltre possibile garantire un preciso indirizzamento dello stesso OV al sito tumorale (Bunuales et al., 2012).

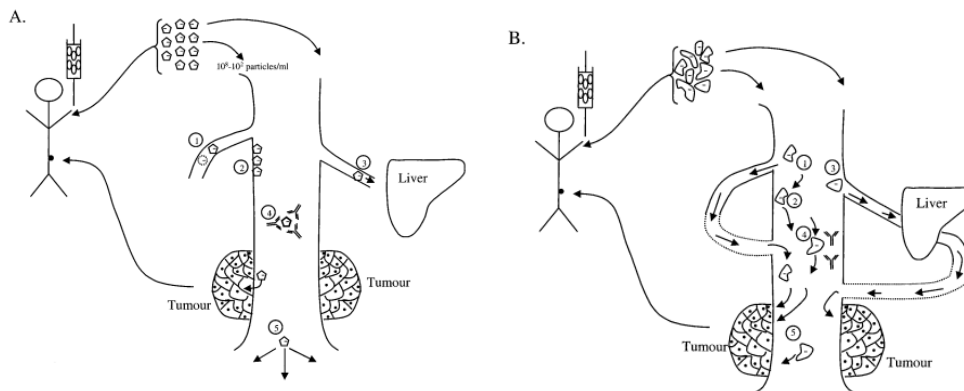


Figura 1. (A) Schema riassuntivo dei diversi meccanismi che causano una riduzione del titolo virale degli OV somministrati endovena: 1) naturale degradazione delle particelle, 2) adesione aspecifica alla superficie di cellule diverse da quelle target, 3) filtraggio da parte di organi come il fegato e i polmoni, 4) neutralizzazione mediata da anticorpi o dal sistema del complemento, 5) mancata extravasazione e arresto degli OV nel sito tumorale. (B) Le cellule *carrier* sono in grado non solo di proteggere l'agente antitumorale, ma anche di veicolarlo in modo specifico verso il microambiente tumorale, dove esso può esplicare la propria funzione e produrre l'effetto terapeutico atteso.

2.5 Scopo dello studio

Attraverso il seguente elaborato di laurea si intende analizzare in modo critico lo studio condotto nel 2022 da Iscaro e collaboratori circa l'incapsulamento di un adenovirus oncolitico specifico per la prostata e regolato da ipossia Ad[I/PPT-E1A] in liposomi rivestiti da CCL2: tale strategia terapeutica, esaminata in modelli murini per il trattamento del tumore alla prostata (PC) metastatizzato, è stata concepita per rendere possibile una somministrazione endovenosa dell'agente antitumorale che risulti essere efficace nella pratica clinica (Iscaro et al., 2022). Tramite l'interazione con il CCR2 espresso sulla superficie dei monociti circolanti richiamati dal tumore, l'Ad[I/PPT-E1A] viene internalizzato da queste cellule *carrier*, e perciò condotto verso le aree ipossiche che caratterizzano il microambiente tumorale (TME). È proprio in queste zone che i monociti, dopo essersi differenziati in macrofagi associati al tumore (TAMs), rilasciano il loro contenuto intracellulare liberando l'OV, il quale è così in grado di infettare e lisare selettivamente le cellule neoplastiche. Tale trattamento clinico proposto ha il vantaggio non solo di diminuire le dimensioni del cancro alla prostata, ma anche di bypassare la coltura ex-vivo di monociti, sfruttando una piattaforma di nanomedica innovativa e in grado di aggirare le difficoltà circa il delivery sistemico degli OV.

3. Materiali e Metodi

3.1 Analisi in vitro

3.1.1 Linee cellulari

Per eseguire il lavoro esaminato in questo elaborato di tesi, i ricercatori hanno utilizzato le seguenti linee cellulari:

-HEK293: si tratta di una linea immortalizzata di cellule embrionali umane di rene, ampiamente utilizzata nella ricerca scientifica come modello per la trasfezione. Sono state isolate per la prima volta nel 1973 in Olanda, e successivamente trasfettate con un Adenovirus al fine di ottenere la linea cellulare utilizzata oggi.

-LNCaP: cellule epiteliali umane isolate nel 1977 a partire da una biopsia per aspirazione con ago dalla metastasi presente nel linfonodo sopraclavicolare sinistro di un maschio caucasico di 50 anni affetto da adenocarcinoma prostatico. Sono cellule utilizzate non solo per la creazione di modelli di xenotrapianti prostatici murini, ma anche per il successivo sviluppo di agenti antitumorali in grado di curare il cancro alla prostata.

Negli esperimenti in vivo eseguiti al fine di dimostrare che lo sviluppo del tumore alla prostata dipende dal sesso, è stato verificato che l'iniezione di LNCaP in modelli murini maschi porta alla comparsa dell'adenocarcinoma prostatico con una frequenza maggiore e in tempi molto più ristretti rispetto ai topi femmina, presumibilmente a causa delle differenze ormonali tra i due sessi.

-PC3: linea cellulare umana di cancro alla prostata, ottenuta nel 1979 a partire dalle metastasi ossee di un tumore prostatico in un uomo caucasico di 62 anni. Sono cellule che, a differenza della linea cellulare sopra descritta, hanno un maggior potenziale metastatico e risultano insensibili agli androgeni, e ciò rende possibile lo studio della progressione tumorale del cancro alla prostata. Con l'avanzare del tempo, infatti, le cellule neoplastiche perdono la suscettibilità nei confronti degli androgeni e diventano maggiormente inclini a metastatizzare nel tessuto osseo.

-LNCaP-LUC: si tratta della linea cellulare LNCaP trasformata stabilmente con un vettore lentivirale PGK-luciferasi-GFP, al fine di esprimere la proteina reporter luciferasi. Questo permette di ottenere istantaneamente e senza bisogno di fissare le cellule, tramite tecniche di imaging, dati sotto forma di segnali bioluminescenti.

Tutte le linee cellulari appena descritte sono state fatte crescere in adesione nel terreno di coltura DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium), addizionato con antibiotici e con il 10% di FBS (siero fetale bovino).

-cellule mononucleate del sangue periferico (PBMC) umane: si tratta di cellule del sangue periferico dotate di un singolo nucleo rotondo, tra cui rientrano i linfociti T e B, le cellule NK, le cellule dendritiche e i monociti. Esse sono state isolate a partire da campioni di buffy coat di sangue, prelevato da soggetti adulti sani, tramite

centrifugazione in gradiente di densità Ficoll. Attraverso questa tecnica, che si basa sull'utilizzo di un polisaccaride idrofilo, è possibile separare le componenti del sangue in uno strato superiore di plasma, seguito da un secondo di PMBC, per finire con un ultimo strato di eritrociti e granulociti che, a causa della loro maggior densità, si accumulano sul fondo della provetta. Ad isolamento concluso, le cellule sono state mantenute in IMDM (Iscove's Modified Dulbecco's Medium) integrato con il 2% di siero umano AB.

-leucociti murini: queste cellule sono state ottenute a partire da campioni di sangue di topo, i quali sono stati inizialmente incubati per dieci minuti con il tampone richiesto per la lisi degli eritrociti, e poi centrifugati per poter lavare via il pellet.

3.1.2 Ceppo virale e Plasmide

In questo lavoro sperimentale, i ricercatori si sono serviti di:

-Ad[I/PPT-E1A]: si tratta di un adenovirus oncolitico (OV) utilizzato in stock da 1×10^{12} PFU in PBS (Phosphate Buffered Saline), conservato a -80°C e titolato attraverso l'Adeno-XTM Rapid Titre Kit. Si tratta di un adenovirus geneticamente modificato in modo da rendere possibile una replicazione virale selettiva nelle cellule neoplastiche prostatiche, con seguente citolisi delle stesse. Esso, infatti, presenta nel proprio genoma la regione precoce adenovirale E1A, essenziale per la replicazione, sotto il controllo della sequenza ricombinante soprannominata PPT, formata dall'enhancer dell'antigene prostatico specifico (PSA), dall'enhancer dell'antigene di membrana prostatico specifico (PSMA) e dal promotore della catena gamma del recettore dei linfociti T (TARP).

-plasmide E1A/B regolato da HRE: consiste in una piccola molecola circolare di DNA extra-cromosomica, dove il gene E1A/B è controllato trascrizionalmente dall'elemento HRE (Hypoxia-Response Element). Quest'ultimo è una sequenza presente nel promotore dei geni indotti da ipossia, che viene riconosciuto e successivamente legato dal fattore di trascrizione HIF (Hypoxia-Inducibile Factor) in condizioni di carenza di ossigeno. Quando ciò accade, aumenta la sintesi di proteine chiave, necessarie per innescare tutta una serie di fenomeni biologici adattativi di risposta alle condizioni ipossiche. Il raggiungimento di bassi livelli di ossigeno è una caratteristica di molti stati patologici, tra cui sicuramente rientra la presenza di una massa tumorale: la crescita incontrollata ed espansiva delle cellule neoplastiche causa una compressione dei tessuti circostanti, con conseguente formazione di un ambiente povero di ossigeno. Per le sue caratteristiche, il plasmide sopra descritto rende possibile la replicazione dell'Ad[I/PPT-E1A] anche in cellule non tumorali, quali i monociti, una volta che queste abbiano raggiunto le zone ipossiche neoplastiche.

3.1.3 Produzione e purificazione di liposomi

In questo lavoro, gli autori hanno scelto di sfruttare un approccio di nanomedica per velocizzare il processo di consegna sistemica degli OV: per bypassare la coltura ex-vivo di monociti, sono stati sintetizzati liposomi vuoti (controllo) e liposomi contenenti sia l'Ad[I/PPT-E1A] che il plasmide E1A/B regolato da HRE (Ad-HRE-E1A LP), rivestiti da CCL2 (si veda Figura 1).

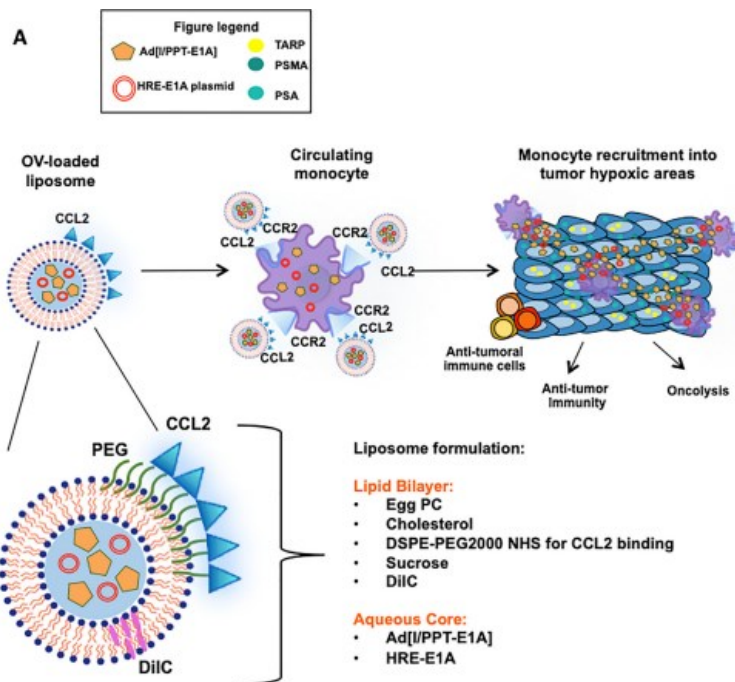


Figura 1. Rappresentazione schematica della struttura del Ad-HRE-E1A LP e del meccanismo attraverso cui lo stesso viene prima reclutato dai monociti circolanti esprimenti CCR2, e poi indirizzato verso il microambiente tumorale, dove viene esplicata la duplice azione dell'OV di uccisione delle cellule neoplastiche e di creazione di un'immunità antitumorale.

I liposomi sono strutture vescicolari formati da un core acquoso racchiuso in un doppio strato lipidico esterno. Per la loro duplice composizione (sia idrofila che idrofobica), queste nanoparticelle rendono possibile la veicolazione alle cellule di una grande varietà di farmaci.

La tecnica sperimentale per la generazione delle vescicole liposomiali adoperata in questo contesto è il metodo di idratazione a film sottile. Dopo aver sciolto i composti lipidici in una soluzione organica, questa viene fatta evaporare tramite un evaporatore rotante mantenuto sotto vuoto, per permettere la creazione di un fine strato lipidico sulle pareti del macchinario. Si passa poi alla fase di idratazione, che avviene mantenendo l'evaporatore in rotazione. Aggiungendo acqua o un tampone, il film lipidico presente nelle pareti del recipiente spontaneamente si stacca e si curva, andando a formare i liposomi veri e propri. L'agente terapeutico che si vuole incapsulare nei drug carriers in fase di produzione viene addizionato, in base alle proprie proprietà chimico-fisiche, o alla fase organica o alla fase acquosa. I liposomi neosintetizzati sono stati poi purificati utilizzando Amicon® Ultra-15 10 K Centrifugal Filter Devices per eliminare le molecole di plasmide e di CCL2 in eccesso; si è usata, invece, l'immunoprecipitazione magnetica per rimuovere l'Ad[I/PPT-E1A] non incapsulato. Quest'ultimo passaggio è di rilevante importanza: essendo che pure l'OV libero è in grado di agire sulle cellule tumorali, la sua eliminazione ha permesso di associare i risultati, circa l'efficacia terapeutica

della tecnica, all'azione dei soli liposomi contenenti l'adenovirus, e non a quella dell'Ad[I/PPT-E1A] non incapsulato.

3.1.4 Microscopio elettronico a trasmissione

Il microscopio è uno strumento utilizzato in laboratorio per poter apprezzare i dettagli di oggetti o di esseri viventi estremamente piccoli, e può essere classificato come ottico se sfrutta la luce visibile, o elettronico se utilizza, per ottenere l'ingrandimento, un fascio di elettroni. Quest'ultima tipologia consente di ottenere immagini con una risoluzione elevata o della superficie dell'oggetto in esame (allora si parla di microscopio elettronico a scansione), o della struttura interna del campione (in tal caso si tratta di microscopio elettronico a trasmissione). Nel progetto sperimentale esaminato in questo elaborato di tesi, gli autori hanno scelto di utilizzare, dopo aver correttamente colorato le particelle con acido fosfotungstico al 1% v/v, il microscopio elettronico a trasmissione FEI Tecnai Biotwin per ottenere immagini circa la morfologia dell'Ad[I/PPT-E1A] non incapsulato, dell'LP vuoto e dell'Ad-HRE-E1A LP.

3.1.5 Analisi di Dynamic Light Scattering (DLS)

La DLS (Dynamic Light Scattering) è una tecnica che consente di misurare il diametro idrodinamico di piccole particelle presenti in soluzioni o emulsioni; dopo che il campione è stato colpito da una luce laser, un detector rileva le variazioni d'intensità della luce diffusa. Il principio alla base di questa metodologia è che le molecole più piccole, muovendosi velocemente, creano delle variazioni d'intensità della luce diffusa più rapide rispetto alle particelle con dimensioni maggiori. In base a queste variazioni è possibile ottenere il coefficiente di diffusione (D) delle molecole stesse, il quale viene convertito in diametro idrodinamico (d_p) attraverso l'equazione di Stokes Einstein seguente:

$$D = \frac{kT}{3\pi\eta d_p}$$

dove k è la costante di Boltzmann, mentre T e η indicano rispettivamente la temperatura e la viscosità del liquido. I ricercatori, avvalendosi del Brookhaven Instruments Corporation ZetaPALS Zeta Potential Analyzer, hanno ottenuto misurazioni circa le dimensioni, l'indice di polidispersione PDI (in un polimero, descrive la distribuzione dei pesi molecolari delle molecole costituenti il polimero stesso) e il potenziale zeta (potenziale che si genera in presenza di un doppio strato elettrico, e che determina la stabilità e l'entità delle interazioni elettrostatiche delle particelle disperse in soluzione) dell'Ad[I/PPT-E1A] libero e dei liposomi (sia vuoti che contenenti l'Ad-HRE-E1A) prima e dopo la purificazione.

3.1.6 Saggio MTT

Esclusivamente nelle cellule vive la succinato deidrogenasi, enzima presente nei mitocondri, è in grado di tagliare l'anello di tetrazolio del bromuro di 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio (o, più semplicemente, MTT), convertendo tale substrato di colore giallo in formazano, un sale blu/violaceo. Tramite questo saggio colorimetrico è perciò possibile misurare la vitalità delle cellule in seguito

all'esposizione delle stesse a determinati farmaci o sostanze tossiche. Nel lavoro in esame, i ricercatori hanno prima trattato le cellule LNCaP e PC3 sia con LP vuoto che con Ad-HRE-E1A LP, poi aggiunto 375 μ L di soluzione MTT 2.5 mg/mL e, infine, misurato la vitalità cellulare espressa come la percentuale dell'assorbanza dei campioni rispetto a quella delle cellule non incubate con i liposomi (cellule che fungono da controllo).

3.1.7 Citometria a flusso

Gli autori hanno utilizzato nel lavoro anche la citometria a flusso. Tale tecnica di laboratorio utilizza uno strumento particolare soprannominato citofluorimetro per l'identificazione, il conteggio e la separazione delle cellule in esame, le quali vengono fatte fluire in un liquido in modo ordinato e continuo. Per rendere possibile ciò, le cellule devono essere prima marcate tramite anticorpi leganti fluorocromi, molecole che, se eccitate a determinate lunghezze d'onda, emettono segnali fluorescenti: le cellule così etichettate, attraversando in fila il citofluorimetro, vengono singolarmente colpite da una luce laser, rilasciando in questo modo segnali luminosi captati da un detector e successivamente analizzati. In particolare, i ricercatori hanno utilizzato il LRSII Flow cytometer, sia per le PBMCs umane che per i globuli bianchi di topo: -le PBMCs umane sono state inizialmente colorate con Zombie UV™, poi classificate considerando l'espressione di CCR2 (sfruttando l'anticorpo FITC) e identificate in base alla presenza di specifici marcatori cellulari (utilizzando il seguente set di anticorpi: CD11b PE Dazzle/594 e CD14 PercP/Cy5.5 per i monociti, CD3 APC/Cy7 per le cellule T, CD19 PE per le cellule B e CD66b AF700 per i granulociti). In più, è stato stimato l'assorbimento da parte delle cellule dei liposomi, sia di quelli rivestiti di CCL2 e colorati con DiD che non, incubando gli stessi per due ore con le PBMCs umane e, per ultimo, misurando la percentuale di cellule DiD+ e di DiD MFI (Mean Fluorescence Intensity).

-i sottotipi di leucociti murini sono stati analizzati utilizzando i seguenti anticorpi: anti-mouse Alexa Fluor®700-Ly6C, anti-mouse/human Alexa Fluor®488- CD11b e anti-mouse PE-CCR2.

3.1.8 Reazioni linfocitarie miste e Cytokine bead array (CBA)

Al fine di valutare l'entità e l'intensità di attivazione del sistema immunitario, i monociti umani sono stati innanzitutto incubati con PBS (controllo), LP vuoto, Ad[I/PPT-E1A], Ad[I/PPT-E1A] LP e Ad-HRE-E1A LP, e poi trattati con cellule LNCaP (secondo un rapporto 1:1) e con linfociti autologhi (rapporto con i monociti 1:6) in condizioni ipossiche (1% di O₂). Per stimare l'attivazione e proliferazione dei leucociti umani, le co-culture sono state analizzate tramite le seguenti tecniche: -citometria a flusso: utilizzando l'anticorpo anti-human CD3 PE-Cy5/CD4 PE/CD8 FITC Cocktail.

-cytokine bead array: saggio di quantificazione che, in modo più veloce rispetto ad altre comuni metodologie quali l'ELISA o il Western Blot, permette di misurare simultaneamente il numero di diversi tipi di citochine, presenti anche in uno stesso campione. Gli autori dell'esperimento hanno scelto di adottare questa tecnica, che

si basa sull'utilizzo di microsfele in grado di catturare le citochine infiammatorie in esame, per misurare i livelli di espressione di IL-2, IFN γ e TNF α , molecole che fungono da marcatori di attivazione delle cellule T.

3.2 Analisi in vivo

3.2.1 Modello di xenotrapianto prostatico ortotopico murino

Per verificare l'efficacia dell'esperimento anche in modelli in vivo, gli autori hanno iniettato 1 milione di cellule LNCaP-LUC nella porzione dorsolaterale della ghiandola prostatica di topi maschi atimici CD-1 per riprodurre il cancro alla prostata in questi organismi. Tali animali da laboratorio mancano del timo e per questo motivo presentano un minor numero di linfociti T rispetto al normale; il fenotipo più evidente che ne risulta è l'assenza di peluria sulla superficie corporea dei topi, che per questo vengono anche chiamati nudi. Inoltre, una seconda conseguenza della presenza di un sistema immunitario indebolito è l'impossibilità di tali animali di rigettare i tessuti ricevuti da specie diverse dalla propria (si parla, per la precisione, di xenotrapianto).

In seguito, i topi sono stati suddivisi in molteplici gruppi in base al trattamento ricevuto: PBS (controllo), Ad[I/PPT-E1A], LP vuoto e Ad-HRE-E1A LP. La prima somministrazione della terapia è avvenuta a distanza di due settimane dall'iniezione delle cellule tumorali, seguita da due successive somministrazioni nei quindici giorni seguenti. Al termine della terza settimana, i modelli murini sono stati sacrificati in modo da rendere possibile l'analisi istologica dei tessuti tumorali.

3.2.2 Istologia e chimica clinica

Dai topi nudi sono stati prelevati i tessuti tumorali di cancro alla prostata e delle metastasi polmonari, e il tessuto epatico, successivamente montati in appositi vetrini per consentire la visualizzazione degli stessi. È stato inoltre possibile agli autori ottenere una quantificazione del numero di macrofagi (cellule F4/80 positive), di vasi sanguigni (cellule CD31 positive) e di cellule positive all'adenovirus, avendo precedentemente aggiunto ai campioni rispettivamente gli anticorpi anti-F4/80, anti-CD31 e l'anti-adenovirus di capra. In ultima istanza, i ricercatori hanno valutato la tossicità del trattamento tramite la misurazione dei seguenti parametri: alanina transaminasi (ALT), aspartato transaminasi (AST), fosfatasi alcalina (ALP), calcio, potassio, fosfato e acido urico; i livelli sierici dei primi tre enzimi aumentano in presenza di danni epatici, mentre un incremento dei restanti metaboliti è legato ad un eccessivo metabolismo degli acidi nucleici intracellulari.

4. Risultati

Gli autori del lavoro sperimentale, che questo elaborato di tesi si propone di analizzare, hanno condotto una serie di test, sia in vitro che in vivo, per verificare l'efficacia della strategia terapeutica da loro progettata. Il trattamento ideato da questi, che si basa su un innovativo approccio di nanomedica, tenta di superare le sfide ancora irrisolte nel campo della viroterapia oncolitica circa il delivery sistemico degli OV per la cura di neoplasie inaccessibili e non responsive alle tradizionali terapie antitumorali.

4.1 Sintesi di liposomi rivestiti da CCL2 e contenenti l'Ad[I/PPT-E1A]

Il punto di partenza dello studio condotto è stato la generazione, attraverso il metodo di idratazione a film sottile, sia di liposomi contenenti l'Ad[I/PPT-E1A] e il plasmide E1A/B regolato da HRE (Ad-HRE-E1A LP), rivestiti da CCL2, che di liposomi vuoti (controllo). In seguito ad un processo di purificazione delle nanoparticelle al fine di eliminare le molecole in eccesso, i liposomi, insieme all'adenovirus nudo, sono stati caratterizzati tramite l'utilizzo di un microscopio elettronico a trasmissione e all'impiego della tecnica DLS. I dati ottenuti da queste due analisi suggeriscono che:

-i liposomi purificati possiedono delle dimensioni che rientrano nel range desiderato (200-300 nm). Questo intervallo circa la morfologia delle particelle assicura, infatti, un efficace assorbimento delle stesse da parte dei monociti.

Per quanto riguarda le dimensioni dell'adenovirus nudo, invece, i valori TEM e DLS sono discordanti (in particolare, il microscopio elettronico a trasmissione fornisce delle misure inferiori rispetto all'analisi DLS). Questa differenza può essere spiegata considerando le caratteristiche intrinseche della seconda metodologia citata: nonostante l'OV utilizzato abbia una geometria icosaedrica, la tecnica DLS misura la dimensione idrodinamica della particella presa in esame, assumendo che essa possieda unicamente una forma sferica.

-ciascun liposoma contiene una sola particella adenovirale. È stato inoltre possibile notare che, durante il processo di incapsulamento, molte particelle virali vengono perse a causa delle particolari condizioni sperimentali (ad esempio, le alte temperature), che provocano un'inevitabile degradazione delle stesse. Sulla base di questo fenomeno, è possibile giustificare la riduzione del titolo di adenovirus incapsulato nei liposomi rispetto a quello dello stock di Ad[I/PPT-E1A] di partenza.

-tramite il processo di purificazione per rimuovere il CCL2 in eccesso e l'OV e il plasmide non incapsulati, l'indice di polidispersione PDI e il potenziale zeta dei liposomi si riducono considerevolmente (si veda Tabella 1 del lavoro allegato). La diminuzione di tali parametri comporta non solo un aumento dell'uniformità, sotto il punto di vista delle dimensioni, delle nanoparticelle in esame, ma anche un incremento della loro stabilità.

4.2 Assorbimento preferenziale dei liposomi rivestiti di CCL2 da parte dei monociti circolanti

Tramite la citometria a flusso, i ricercatori hanno scoperto che i monociti (identificati come cellule CD11b + CD14+) sono la tipologia di leucociti umani circolanti che maggiormente espone la molecola CCR2 sulla superficie cellulare; il 96.6% degli stessi, infatti, presenta questa caratteristica, a differenza delle altre PBMCs dove le percentuali sono minori. Pure nei modelli di topo è stato riscontrato un risultato analogo, con un 88.8% delle cellule Ly6C + CD11b + (monociti circolanti murini) esprimenti CCR2.

In più, colorando i liposomi rivestiti da CCL2 con DiD e misurando la percentuale di cellule DiD+ e di DiD MFI (si veda Figura 2 del lavoro allegato), è stato possibile verificare che i monociti umani sono i globuli bianchi che in più grande misura assorbono non solo i liposomi Ctr-LP (si ipotizza che ciò sia dovuto all'intensa attività fagocitaria di queste cellule), ma soprattutto i liposomi rivestiti da CCL2 (questo grazie all'interazione CCL2-CCR2).

4.3 Lisi delle cellule tumorali prostatiche da parte dell'Ad-HRE-E1A LP

I risultati ottenuti dal saggio colorimetrico MTT (si veda Figura 3 B dello studio allegato), condotto dagli autori del progetto al fine di valutare la vitalità cellulare, hanno permesso di formulare le seguenti conclusioni: l'incapsulamento dell'Ad[I/PPT-E1A] e del plasmide E1A/B regolato da HRE in liposomi rivestiti da CCL2 e la successiva purificazione degli stessi sono procedure sperimentali che non riducono l'attività citolitica dell'agente virale utilizzato. Ciò risulta chiaro nel trattamento a MOI (Molteplicità di Infezione) 0.075 e 0.1 della linea LNCaP con l'Ad-HRE-E1A LP purificato, dove la vitalità cellulare risulta diminuita rispettivamente al 49.41% e al 79.87%. In modo analogo, l'utilizzo dell'Ad-HRE-E1A LP purificato fornisce dati incoraggianti anche negli esperimenti condotti sulle cellule PC3.

D'altra parte, i test compiuti sia su cellule LNCaP che PC3, trattate con LP vuoto (controllo), suggeriscono che l'utilizzo di tali nanoparticelle, nella specifica formulazione studiata e adottata dagli autori del lavoro sperimentale, non induce alcuni effetti tossici cellulari, permettendo di considerare quest'ultime un sistema di drug delivery davvero efficace e allo stesso tempo sicuro sotto il punto di vista del profilo farmacologico.

4.4 Il plasmide E1A/B regolato da HRE è essenziale per il corretto funzionamento dell'Ad[I/PPT-E1A]

Negli studi in vitro appare indispensabile la presenza del plasmide HRE-E1A/B per permettere all'Ad[I/PPT-E1A] di esplicare le proprie funzioni di uccisione delle cellule tumorali prostatiche. Allestendo una reazione linfocitaria mista, i monociti umani non solo sono stati incubati, in condizioni di carenza di ossigeno, con cellule LNCaP (rapporto 1:1) e con linfociti autologhi (rapporto 1:6 con i monociti), ma sono anche stati trattati con diverse terapie (PBS, LP vuoto, Ad[I/PPT-E1A],

Ad[I/PPT-E1A] LP e Ad-HRE-E1A LP). A prova di quanto precedentemente sostenuto, l'attivazione, la proliferazione e la successiva espressione di citochine infiammatorie (IL-2, IFN γ e TNF α) da parte delle cellule T appare nettamente superiore nelle co-culture che hanno ricevuto, come trattamento, l'Ad-HRE-E1A LP rispetto a quelle dove il plasmide HRE-E1A/B non è stato fornito.

4.5 Efficacia dell'azione dell'Ad-HRE-E1A LP contro i tessuti neoplastici

Concluse le analisi in vitro, gli autori del lavoro hanno creato un modello di xenotrapianto prostatico ortotopico murino tramite l'iniezione intra-prostatica di 1 milione di cellule LNCaP-LUC in topi maschi atimici CD-1. Dopo 2 settimane di sviluppo e crescita tumorale, agli animali, divisi in quattro gruppi in base al trattamento ricevuto (PBS, LP vuoto, Ad[I/PPT-E1A] e Ad-HRE-E1A LP), sono state somministrate tre dosi delle diverse terapie, rispettivamente al 14°, al 17° e al 21° giorno dopo la data di inoculazione delle cellule cancerose. Infine, i topi nudi sono stati sacrificati e i tessuti tumorali esaminati. Già con la prima iniezione, i risultati appaiono chiari: tra i quattro trattamenti testati, l'utilizzo dell'Ad-HRE-E1A LP si classifica come il migliore per ottenere un'effettiva riduzione delle dimensioni della massa neoplastica prostatica. I dati ottenuti, però, mettono in luce anche altri aspetti interessanti:

-la terapia basata sull'Ad-HRE-E1A LP, rispetto a quella che impiega il solo virus nudo, richiede di somministrare circa mille volte meno OV. Ciò si può verificare osservando la colorazione di immunofluorescenza (si veda Figura 4 C del lavoro allegato), dove i segnali luminosi provenienti dai tessuti tumorali sono molto più intensi nel gruppo di topi trattati con l'Ad-HRE-E1A LP in confronto a quelli trattati con l'Ad[I/PPT-E1A]. Questo indica che l'utilizzo dei liposomi permette effettivamente di proteggere l'adenovirus quando esso è presente nel flusso ematico, mantenendo alto il titolo virale in modo da garantire l'efficacia terapeutica del trattamento.

-l'OV, a livello della massa tumorale, si concentra e agisce soprattutto in prossimità dei vasi sanguigni; non a caso, i monociti circolanti, che fungono da cellule *carrier* per l'OV, arrivano proprio dal flusso ematico.

-l'uccisione delle cellule tumorali da parte dell'Ad[I/PPT-E1A] non riguarda solo la ghiandola prostatica, ma anche le metastasi polmonari, il cui numero si riduce considerevolmente in seguito alla somministrazione dell'Ad-HRE-E1A LP. Per quanto riguarda il tessuto epatico, invece, è stata misurata in quest'organo un'irrelevante percentuale di cellule positive all'OV; questo rappresenta un dato incoraggiante circa il profilo tossicologico della strategia terapeutica proposta.

-nella misurazione dei livelli di determinati parametri per condurre gli studi di tossicologia, la differenza maggiormente significativa è stata riscontrata nella concentrazione della fosfatasi alcalina; l'incremento di tale enzima in seguito all'iniezione dell'Ad-HRE-E1A LP risulta insignificante se confrontato con l'aumento che si verifica dopo la somministrazione del solo adenovirus nudo.

Questo risultato, circa la diminuzione della tossicità nel caso in cui si ricorra all'utilizzo dei liposomi, è un'ulteriore punto a favore nell'impiego degli stessi.

-le cellule che risultano positive al virus non sono esclusivamente cellule neoplastiche, ma anche cellule dei vasi sanguigni che compongono il parenchima tumorale e cellule macrofagiche. La capacità dell'Ad-HRE-E1A LP di veicolare pure la vascolarizzazione della massa neoplastica e i macrofagi associati al tumore (TAMs) si traduce in un rimodellamento del microambiente tumorale; quest'ultimo fenomeno è caratterizzato dalla diminuzione dell'apporto ematico (necessario per la crescita del cancro e per il processo di metastatizzazione) e dall'uccisione di quelle cellule del sistema immunitario che hanno l'anomala capacità di promuovere lo sviluppo della neoplasia.

Riassumendo, i dati ottenuti dai ricercatori forniscono dei risultati davvero promettenti circa l'utilizzo dei liposomi come piattaforma di nanomedica per rendere possibile un'efficace delivery sistemico dell'OV scelto, al fine di veicolare e uccidere in modo specifico le cellule tumorali, stimolando allo stesso tempo il sistema immunitario nella generazione di un'immunità antitumorale sistemica.

5. Discussione

5.1 Il delivery sistemico dei virus oncolitici

La continua ricerca nella lotta contro il cancro ha permesso negli ultimi anni alla viroterapia oncolitica di affermarsi come interessante frontiera per la cura dei tumori. I virus oncolitici, agenti biologici opportunamente modificati a livello genomico al fine di migliorarne il profilo di sicurezza, non solo si replicano e uccidono selettivamente le cellule neoplastiche, rendendo possibile la diminuzione in termini di dimensione della lesione neoplastica, ma stimolano anche l'attività del sistema immunitario nella generazione di un'immunità tumore-specifica duratura e stabile (Howells et al., 2017). Il primo e attualmente unico OV approvato nella pratica clinica è il Talimogene Laherparepvec, un HSV-1 attenuato la cui iniezione intratumorale garantisce la regressione del melanoma non resecabile (Hamid et al., 2017). Le nuove aspirazioni, però, cercano di superare il limite rappresentato dalla possibilità di curare solamente tumori circoscritti in modo definito, di facile accessibilità e non metastatizzati. Per questo, di recente si è cercato di sfruttare le caratteristiche intrinseche della massa neoplastica per sviluppare strategie cliniche che non si riducano ad una semplice azione locale (Bell, 2012). Il parenchima neoplastico è costituito da numerosi vasi sanguigni, i quali sia forniscono nutrienti e ossigeno, sostenendo così la crescita tumorale, sia permettono alle cellule cancerose di raggiungere distretti corporei diversi da quello del tumore primitivo, dove esse possono localizzarsi e dar vita alle metastasi. Questa stretta dipendenza della neoplasia nei confronti del flusso ematico suggerisce di usufruire dello stesso per la veicolazione degli agenti antitumorali a neoplasie profonde e non responsive alle terapie tradizionali (Bell, 2012). Esistono però molteplici problematiche circa la presenza del virus libero all'interno del flusso ematico, che rendono ragione della considerevole diminuzione del titolo virale nel tempo (Harrington et al., 2002). La graduale riduzione della biodisponibilità dell'agente immunoterapico non consente di raggiungere la minima concentrazione efficace di OV al target molecolare per garantire il successo del trattamento terapeutico.

5.2 Impiego di cellule *carrier*

Al fine di evitare la clearance subita nei vasi sanguigni dal virus oncolitico da parte dei sistemi di difesa biologici, si è pensato di usufruire delle cosiddette cellule *carrier*, ovvero di cellule che fungono da "cavalli di Troia" in quanto internalizzano e contemporaneamente trasportano l'OV verso il microambiente tumorale, essendo richiamate da esso tramite segnali chemiotattici. Le cellule *carrier* svolgono, in questo senso, la duplice funzione di protezione dell'agente terapeutico somministrato nella circolazione sistemica e di consegna dello stesso esclusivamente alla massa neoplastica, avendo esse un tropismo preferenziale per quest'ultima. Ciò permette di mantenere il titolo virale alto anche con un numero

minimo di dosi e, allo stesso tempo, di ridurre la tossicità associata al processo terapeutico (Bunuales et al., 2012).

5.3 TAM

La tipologia cellulare maggiormente utilizzata per il delivery sistemico dell'OV è costituita dai monociti circolanti; si tratta di cellule del sistema immunitario innato che, in condizioni fisiologiche, raggiungono la massa neoplastica, dove si differenziano in macrofagi, e bersagliano le cellule cancerose al fine di eliminarle (Kadamoto et al., 2021). Spesso, però, i monociti perdono le loro normali caratteristiche biologiche e, piuttosto, acquisiscono l'anomala peculiarità di essere richiamati al sito tumorale, tramite molecole chemiotattiche rilasciate dalle cellule neoplastiche stesse. Infiltratisi nel microambiente tumorale (TME), i macrofagi, in questo caso specifico chiamati macrofagi associati al tumore (TAMs), favoriscono molteplici step determinanti la progressione tumorale, quali l'angiogenesi, l'invasione dei tessuti e la metastatizzazione, svolgendo in tal senso un'azione protumorale (Noy et al., 2014). Il TAM, in particolare, è una cellula esprimente i marcatori caratteristici sia dei macrofagi con fenotipo M1 che M2, e che rilascia segnali (ad esempio, VEGF e TGF β) necessari per un'evoluzione, in senso maligno, della neoplasia (Kadamoto et al., 2021). Inoltre, mostrando sulla superficie cellulare particolari ligandi, come PD-1L e FasL, inibisce l'attività delle cellule effettrici immunitarie, quali i linfociti T citotossici, che esternalizzano i recettori corrispondenti; tramite questo meccanismo, il TAM esercita anche un ruolo immunosoppressivo (Noy et al., 2014). Essendo i macrofagi associati al tumorale, solitamente, la tipologia cellulare non cancerosa maggiormente rappresentata nel microambiente tumorale, disegnare una strategia terapeutica che richieda l'impiego degli stessi potrebbe quindi rivelarsi una soluzione davvero valida per la cura di tumori con una prognosi infausta (Noy et al., 2014). L'efficienza circa l'impiego dei monociti quali cellule portatrici dell'OV, tuttavia, è ancora da accertare, come suggeriscono i risultati emersi dal lavoro sperimentale condotto da Bunuales e collaboratori nel 2012. Gli autori dello studio hanno testato la validità scientifica della strategia terapeutica da loro proposta, basata sull'utilizzo di un adenovirus oncolitico esprimente la luciferasi somministrato endovena e sull'internalizzazione dello stesso da parte dei monociti, su ben due modelli in vivo di xenotrapianto tumorale, ovvero su topi atimici e criceti siriani. A causa, probabilmente, delle differenti caratteristiche biologiche tra queste due specie, i dati emersi a partire dai due animali sono apparsi discordanti. Mentre nel modello murino i risultati si sono rivelati incoraggianti, nel criceto l'impiego di linee cellulari monocitiche ha portato ad un'espressione del transgene (calcolata in base al rilevamento di segnali bioluminescenti) quasi esclusivamente epatica; la veicolazione dell'OV al fegato piuttosto che al sito tumorale si traduce in una strategia terapeutica con una bassa efficienza e con un'elevata tossicità (Bunuales et al., 2012).

Le conclusioni che si possono trarre da tale studio indicano, quindi, di verificare l'azione della cellula *carrier* candidata in diversi modelli animali, prima dell'impiego della stessa come trattamento clinico.

5.4 Altre varietà di cellule *carrier*

Oltre ai monociti circolanti, esistono altre tipologie cellulari che potenzialmente possono fungere da “cavalli di Troia” per il delivery sistemico dell'OV. Tra queste vale la pena citare:

-i linfociti T: dopo i macrofagi associati al tumore, sono il tipo di leucociti infiltranti la neoplasia maggiormente abbondante. Si tratta di cellule circolanti nel flusso ematico, con funzioni citotossiche, e che per natura vengono reclutate verso il sito neoplastico, in quanto attratte dagli antigeni tumorali esternalizzati dalle cellule cancerose o rilasciati nell'ambiente biologico in seguito a morte delle stesse. Alcuni studi che si basano sull'utilizzo di questi leucociti riportano un'efficiente consegna sistemica dell'OV, grazie ad una prima adesione aspecifica dello stesso alla superficie dei linfociti T, seguita dal trasporto al microambiente tumorale (Cole et al., 2005).

-le cellule staminali: il grande vantaggio associato all'utilizzo di queste linee cellulari è rappresentato dalla loro elevata flessibilità; essendo cellule ancora indifferenziate, infatti, è possibile favorire in vitro l'acquisizione da parte delle stesse dell'esatto fenotipo desiderato (Harrington et al., 2002). Delle applicazioni interessanti sono l'impiego di cellule staminali neurali per la cura di tumori intracranici (Reale et al., 2021), oppure di cellule staminali indotte a differenziarsi in cellule endoteliali per bersagliare i neovasi sanguigni della massa neoplastica (Harrington et al., 2002).

-cellule che partecipano alla patogenesi neoplastica: per citare un caso peculiare, si consideri ciò che accade nel tessuto osseo; in condizioni fisiologiche, l'osso subisce un continuo rimodellamento, dato dall'azione combinata degli osteoblasti (che depongono nuovo tessuto osseo) e degli osteoclasti (che assorbono il tessuto vecchio). In presenza di metastasi ossee, invece, si verifica spesso un anomalo richiamo preferenziale degli osteoclasti da parte delle cellule cancerose; l'accumulo di questi nei siti metastatici determina un'eccessiva distruzione dell'osso, con conseguente rilascio di molecole (come fattori di crescita) che concorrono alla crescita tumorale (Harrington et al., 2002). È plausibile, quindi, sfruttare la concentrazione di queste cellule presso le aree metastatizzate per indirizzarvi l'agente antitumorale virale.

5.5 Delivery sistemico dell'OV assistito da liposomi

Un ulteriore passo avanti nello sviluppo di nuove tecniche per un'efficace consegna sistemica dell'OV è rappresentato dalla possibilità di evitare la coltura ex-vivo di cellule *carrier*, immettendo quindi l'agente biologico direttamente nel flusso ematico. In tal caso, però, bisogna avvalersi di un sistema appropriato che assicuri l'internalizzazione del virus oncolitico presente nei vasi sanguigni da parte delle

cellule deputate al trasporto dello stesso verso la massa tumorale. A questo proposito, nel 2022 Iscaro e collaboratori hanno proposto l'incapsulamento di un adenovirus modificato specifico per la prostata (Ad[I/PPT-E1A]) e di un plasmide indotto da ipossia (plasmide E1A/B regolato da HRE) in liposomi rivestiti da CCL2, come trattamento antitumorale del cancro alla prostata (Iscaro et al., 2022). La piattaforma di nanomedica suggerita dagli autori è stata accuratamente progettata, sfruttando le conoscenze circa i meccanismi patogenetici tipici neoplastici, per assicurare l'efficacia terapeutica della strategia ideata. In un'ampia gamma di neoplasie (tra cui rientra il cancro alla ghiandola prostatica), infatti, le cellule tumorali sovraesprimono la chemochina CCL2; si tratta di una proteina monomerica con un peso molecolare prossimo ai 15 kDa, capace di richiamare una grande varietà di linee cellulari. In presenza di un processo neoplastico, questo polipeptide, invece che stimolare l'attività del sistema immunitario nella difesa dell'organismo, come accade in contesti fisiologici, permette al microambiente tumorale di reclutare efficacemente i monociti circolanti nel sangue, i quali presentano sulla superficie cellulare il recettore 2 delle chemochine CCR2 (proteina costituita da sette α -elicke transmembrana, associata a proteine G, e che lega CCL2). L'interazione CCL2-CCR2 consente di indirizzare le cellule immunitarie verso la massa neoplastica dove, differenziatisi in TAM, sostengono la crescita e la progressione tumorale (Kadomoto et al., 2021). Sfruttare l'asse CCL2-CCR2, ricoprendo le nanoparticelle con la chemochina in questione, rende possibile una prima internalizzazione del contenuto liposomiale da parte delle cellule *carrier* monocitiche, seguita dal trasporto dello stesso verso le aree ipossiche del microambiente tumorale. I bassi livelli di ossigeno innescano una produttiva replicazione dell'adenovirus a partire dal plasmide contenente l'elemento HRE (sequenza di DNA tipica dei promotori dei geni la cui espressione è indotta da ipossia). Una volta che i macrofagi associati al tumore hanno rilasciato i virioni neoformati, questi ultimi sono in grado autonomamente di infettare e lisare le cellule neoplastiche prostatiche, grazie alla presenza nel loro genoma modificato dell'elemento ricombinante PPT. L'impiego, per l'appunto, di sequenze regolatorie tumore-specifiche a monte di geni virali indispensabili per il ciclo replicativo (in questo contesto, E1A) restringe il tropismo dell'OV alle sole cellule cancerose, al fine di minimizzare la tossicità indesiderata associata alla strategia terapeutica e preservare i tessuti sani (Hamid et al., 2017).

I risultati incoraggianti emersi dai test condotti sia in vitro che in modelli murini (Iscaro et al., 2022) fanno riporre grandi speranze nello sfruttamento delle vescicole liposomiali come garanzia per un'efficace delivery sistemico dei virus oncolitici.

5.6 Considerazioni finali

Al trattamento terapeutico ideato da Iscaro e collaboratori per la cura del cancro alla prostata sono associati molteplici vantaggi; oltre al rallentamento della crescita del tumore primitivo, potenzialmente si verificano anche la diminuzione del numero di metastasi, l'inibizione (tramite riduzione della popolazione monocitica) dei

TAMs nel sostenere la progressione tumorale, un'attiva stimolazione del sistema immunitario in seguito al rilascio di antigeni neoplastici, e la possibilità di bypassare la coltura cellulare ex-vivo. In più, molto valida si è rivelata essere la scelta di utilizzare i liposomi come sistema di drug delivery; queste nanoparticelle, per l'appunto, oltre a proteggere efficacemente l'OV e a non indurre particolari effetti tossici, mostrano delle proprietà chimico-fisiche tali da risultare facilmente manipolabili, estremamente biocompatibili e poco immunogene. Infine, è importante sottolineare che gli autori dello studio, per ottenere dei dati il più possibile attendibili e validi scientificamente, hanno condotto esperimenti sia in vitro, che in modelli animali. Tutto ciò rende la proposta terapeutica in esame davvero interessante e attraente, nonostante ci siano, però, molteplici punti critici che richiedono un maggiore studio. Il primo aspetto riguarda sicuramente il gran numero di passaggi che il trattamento prevede; per quanto questo sia presumibilmente stato ricercato al fine di aumentare la precisione legata alla strategia medica, è anche doveroso considerare come incrementi la probabilità di fallimento terapeutico. Un'altra questione interessa la scelta dei monociti come cellule *carrier*; in presenza di studi scientifici che mettono in dubbio l'efficacia di questi nella consegna sistemica dell'OV in specifici modelli animali (Bunuales et al., 2012), in futuro sarebbe interessante replicare lo stesso tipo di approccio sperimentale impiegando linee cellulari alternative. Un ultimo possibile problema è dato dalle caratteristiche biologiche dei modelli animali utilizzati per condurre i test in vivo; i topi atimici CD-1, infatti, sono organismi immunodeficienti, e ciò comporta che i risultati ottenuti siano riferiti ad una risposta immunitaria più debole rispetto al normale. In più, per la conduzione degli studi sperimentali, questi animali hanno richiesto l'impianto di cellule umane di tumore alla prostata, dato che l'adenovirus non replica efficacemente in quelle murine (Iscaro et al., 2022). Per avere un quadro più completo e dei dati maggiormente attendibili si propone, perciò, di sperimentare la strategia terapeutica in esame partendo da modelli animali immunocompetenti e/o da agenti virali in grado di completare il ciclo replicativo nelle cellule dell'organismo ospite scelto.

In conclusione, la proposta di Iscaro e collaboratori circa l'impiego di cellule *carrier* e l'incapsulamento dell'OV in nanoparticelle liposomiali può essere considerata un trattamento antitumorale davvero valido; nonostante ciò, è importante che la ricerca nell'ambito della viroterapia oncolitica continui, con l'obiettivo di progettare e, successivamente, perfezionare nuove strategie terapeutiche, al fine di migliorare concretamente la qualità di vita dei pazienti oncologici.

6. Bibliografia

- 1) Iscaro A, Jones C, Forbes N, Mughal A, Howard FN, Janabi HA, Demiral S, Perrie Y, Essand M, Weglarz A, Cruz LJ, Lewis CE, Muthana M. Targeting circulating monocytes with CCL2-loaded liposomes armed with an oncolytic adenovirus. *Nanomedicine*. 2022 Feb;40:102506. doi: 10.1016/j.nano.2021.102506. Epub 2021 Dec 5. PMID: 34875352.
- 2) Howells A, Marelli G, Lemoine NR, Wang Y. Oncolytic Viruses- Interaction of Virus and Tumor Cells in the Battle to Eliminate Cancer. *Front Oncol*. 2017 Sep 8;7:195. doi: 10.3389/fonc.2017.00195. PMID: 28944214; PMCID: PMC5596080.
- 3) Hamid O, Hoffner B, Gasal E, Hong J, Carvajal RD. Oncolytic immunotherapy: unlocking the potential of viruses to help target cancer. *Cancer Immunol Immunother*. 2017 Oct;66(10):1249-1264. doi: 10.1007/s00262-017-2025-8. Epub 2017 Jul 15. PMID: 28712033; PMCID: PMC5626801.
- 4) Bell JC. The virus that came in from the cold. *Sci Transl Med*. 2012 Jun 13;4(138):138fs17. doi: 10.1126/scitranslmed.3004139. PMID: 22700951.
- 5) Cole C, Qiao J, Kottke T, Diaz RM, Ahmed A, Sanchez-Perez L, Brunn G, Thompson J, Chester J, Vile RG. Tumor-targeted, systemic delivery of therapeutic viral vectors using hitchhiking on antigen-specific T cells. *Nat Med*. 2005 Oct;11(10):1073-81. doi: 10.1038/nm1297. Epub 2005 Sep 18. PMID: 16170322.
- 6) Harrington K, Alvarez-Vallina L, Crittenden M, Gough M, Chong H, Diaz RM, Vassaux G, Lemoine N, Vile R. Cells as vehicles for cancer gene therapy: the missing link between targeted vectors and systemic delivery? *Hum Gene Ther*. 2002 Jul 20;13(11):1263-80. doi: 10.1089/104303402760128504. PMID: 12162810.
- 7) Bunuales M, Garcia-Aragoncillo E, Casado R, Quetglas JI, Hervas-Stubbs S, Bortolanza S, Benavides-Vallve C, Ortiz-de-Solorzano C, Prieto J, Hernandez-Alcoceba R. Evaluation of monocytes as carriers for armed oncolytic adenoviruses in murine and Syrian hamster models of cancer. *Hum Gene Ther*. 2012 Dec;23(12):1258-68. doi: 10.1089/hum.2012.043. Epub 2012 Oct 26. PMID: 22985305; PMCID: PMC3523252.
- 8) Kadamoto S, Izumi K, Mizokami A. Roles of CCL2-CCR2 Axis in the Tumor Microenvironment. *Int J Mol Sci*. 2021 Aug 8;22(16):8530. doi: 10.3390/ijms22168530. PMID: 34445235; PMCID: PMC8395188.
- 9) Noy R, Pollard JW. Tumor-associated macrophages: from mechanisms to therapy. *Immunity*. 2014 Jul 17;41(1):49-61. doi: 10.1016/j.immuni.2014.06.010. Erratum in: *Immunity*. 2014 Nov 20;41(5):866. PMID: 25035953; PMCID: PMC4137410.
- 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.



ELSEVIER



BASIC SCIENCE

Nanomedicine: Nanotechnology, Biology, and Medicine
40 (2022) 102506



nanomedjournal.com

Original Article

Targeting circulating monocytes with CCL2-loaded liposomes armed with an oncolytic adenovirus

Alessandra Icaro, PhD^a, Christian Jones, MSc^a, Neil Forbes, PhD^b, Amina Mughal, BSc^a, Faith Nutter Howard, PhD^a, Haider Al Janabi, PhD^a, Secil Demiral, MSc^a, Yvonne Perrie, PhD^b, Magnus Essand, PhD^c, Aleksandra Weglarz, MSc^a, Luis J. Cruz, PhD^d, Claire E. Lewis, PhD^a, Munitta Muthana, PhD^{a,*}

^aDepartment of Oncology & Metabolism, University of Sheffield, Sheffield, UK

^bStrathclyde Institute of Pharmacy and Biomedical Sciences, University of Strathclyde, Glasgow, Scotland

^cDepartment of Immunology, Genetics and Pathology, Uppsala University, Uppsala, Sweden

^dDepartment of Radiology, Division Translational Nanobiomaterials and Imaging, Leiden University Medical Center, Leiden, The Netherlands

Revised 17 September 2021

Abstract

Oncolytic viruses (OVs) selectively replicate in and destroy cancer cells resulting in anti-tumor immunity. However, clinical use remains a challenge because of virus clearance upon intravenous delivery. OV packaging using a nanomedicine approach could overcome this. Here we encapsulate an oncolytic adenovirus (Ad[I/PPT-E1A]) into CCL2-coated liposomes in order to exploit recruitment of CCR2-expressing circulating monocytes into tumors. We demonstrate successful encapsulation of Ad[I/PPT-E1A] into CCL2-coated liposomes that were preferentially taken up by CCR2-expressing monocytes. No complex-related toxicities were observed following incubation with prostate tumor cells and the encapsulation did not affect virus oncolytic activity *in vitro*. Furthermore, intravenous administration of our nanomedicine resulted in a significant reduction in tumor size and pulmonary metastasis in prostate cancer-bearing mice whereby a 1000-fold less virus was needed compared to Ad[I/PPT-E1A] alone. Taken together our data provide an opportunity to target OVs *via* circulation to inaccessible tumors using liposome-assisted drug delivery.

© 2021 Elsevier Inc. All rights reserved.

Key words: Oncolytic virus; Adenovirus; Liposomes; Monocytes; Chemokine receptor 2; Prostate cancer

Prostate cancer (PC) is the second most frequent cancer and the fifth leading cause of cancer death in men, with 1.3 million new cases and 359,000 deaths worldwide in 2018.^{1,2} PC incidence and mortality increase with age and the incidence rate is 60% in men over the age of 65³ where 55% of all deaths occur.⁴

Unfortunately, current therapies for PC have undesirable side-effects and can be effective only in the initial phase of the disease.^{2,5–8} In the last few years, immunotherapy has been applied to several cancers, including PC.⁹ Indeed, the presence of tumor infiltrating lymphocytes within the PC tumor microenvironment,¹¹ together with the fact that PC is relatively slow growing, makes it an ideal candidate for immunotherapy.^{9,11,12}

Oncolytic viruses (OVs) are emerging as important cancer immunotherapies. OVs offer the attractive combination of tumor-specific cell killing together with immune stimulation, therefore acting as potential *in-situ* tumor vaccines.^{10,13–17} Moreover, OVs can be engineered for optimization of tumor selectivity and enhanced immune stimulation.^{18,19} Several thymidine kinase (TK) adenoviruses Ad5-CD/TK OVs have been developed to deliver the suicide gene cytosine deaminase (CD) to prostate tumors^{19–21} and in a phase I trial in patients with localized PC the combination of Ad5-CD/TK with intensity-modulated radiotherapy demonstrated safety and no additional toxicities.²² Consequently, several OVs are currently undergoing clinical trials as anti-cancer agents and in 2015 Talimogene

* Corresponding author at: Department of Oncology & Metabolism, University of Sheffield, Sheffield, UK.
E-mail address: m.muthana@sheffield.ac.uk (M. Muthana).

laherparepvec (T-Vec), an attenuated herpes simplex virus (HSV), was approved by the FDA as the first OV for the intratumoral treatment of advanced melanoma.^{10,21–23}

Despite these advancements, the full potential of OVs has not been achieved due to their immunogenic nature, resulting in clearance upon intravenous delivery.^{12,14} To overcome this challenge, we propose the encapsulation of a hypoxia regulated prostate-specific oncolytic adenovirus (Ad) Ad[I/PPT-E1A] into CCL2-conjugated liposomes (LP). Our idea is to exploit liposome uptake by CCR2-expressing circulating monocytes to deliver the OV directly to tumor hypoxic areas where the monocytes can release the OV, allowing its selective tumor cell killing (Figure 1). In the tumor microenvironment (TME), chemokine (C-C motif) ligand 2 (CCL2) interacts with the chemokine receptor 2 (CCR2) to mediate chemotaxis of monocytes and tumor-associated macrophages (TAMs), which consequently contributes to shaping of the tumor microenvironment.^{24,25} Several studies have shown that these monocytes accumulate in poorly vascularized tumor hypoxic areas where they differentiate into TAMs.^{26,27} We have previously shown that *ex-vivo* cultured monocytes/macrophages can be used to deliver gene therapies including OVs to hypoxic areas in prostate tumors.^{28,29} In this study we want to bypass *ex-vivo* culture of cells by targeting OV to monocytes in circulation using a nanomedicine approach based on liposome-assisted delivery. We demonstrate successful encapsulation of Ad[I/PPT-E1A] into liposomes (LPs) characterized by a lipid formulation specifically made for our aim. LPs are an attractive delivery system due to their flexible physicochemical and biophysical properties, which allow easy manipulation to address different delivery considerations. Moreover, we show that the encapsulation does not interfere with the virus killing activity of prostate cancer cells *in vitro* and *in vivo*.

Methods

Details of reagents and additional methods can be found in the supplementary materials.

Cell culture

HEK293, PC3 and LNCaP cells were purchased from the European Collection of Cell Cultures (ECACC). LNCaP-LUC cells were kindly provided by Prof. Magnus Essand (Uppsala, Sweden). Cells were maintained in DMEM or RPMI supplemented with 10% FBS and antibiotics. Human adult blood buffy coat samples from healthy donors were obtained from the Sheffield Blood Transfusion (Ethical approval SMBRER139). Human PBMCs were isolated from the adult blood buffy coats as described by us¹¹ and in the supplementary material by Ficoll (Histopaque-1077, Sigma Aldrich) density gradient centrifugation according to manufacturer's procedures and then maintained in IMDM supplemented with 2% human AB serum (Sigma Aldrich, UK). Mouse blood samples were collected by intra cardiac perfusion of 0.76% sodium citrate (sodium citrate in PBS with 1% FBS), which is an anticoagulant buffer. Blood was collected and incubated for 10 min with lysis buffer (10× stock solution: in 1 L of deionized water: 89.9 g NH₄Cl, 10.0 g

KHCO₃, 370.0 mg tetrasodium EDTA) for red blood cells lysis. Samples were centrifuged for 5 min at 550 rpm and a pellet was washed in 1% FBS-PBS three times. Finally, cells were resuspended in 1% FBS 1× PBS.

Virus and plasmid production, handling and titration

The genetically modified Ad[I/PPT-E1A]³⁰ was kindly provided by Prof. Magnus Essand (Uppsala, Sweden) in stocks of 1×10^{12} particle forming units (PFU) in PBS. All vials were stored at -80°C and freshly thawed on ice before each experiment. The HRE-regulated E1A/B plasmids were produced as previously described²⁹ and used to allow the OV to replicate in non-prostate tumor cells, such as monocytes/macrophages within tumor hypoxic areas.²⁸

Virus titer was calculated using the Adeno-XTM Rapid Titre Kit (Clontech), following the manufacturer's instructions.

Synthesis and purification of Ad-HRE-E1A-loaded liposomes

For the generation of Ad[I/PPT-E1A]/HRE-E1A/B-loaded liposomes (Ad-HRE-E1A LP) and Empty LP as a control, a film hydration method was used. Free CCL2 and un-encapsulated plasmid were removed using Amicon® Ultra-15 10 K Centrifugal Filter Devices at 10,500 rpm for 12 min at 25°C while un-encapsulated Ad[PPT/E1A] was removed through magnetic immunoprecipitation.

Transmission electron microscopy (TEM)

The morphology of the Ad[I/PPT-E1A] and the LP was determined through TEM. A FEI Tecnai Biotwin microscope was used, at 120 kV with an Orius 1000 camera. Ten microliters of sample was added to an etched carbon-coated copper grid and left for 1 min. Excess fluid was removed with tissue and the grids gently placed on water droplets to wash. Viral particles were stained by dropping the grid onto 1% phosphotungstic acid. An acceleration voltage of 80 kV was used, and images were recorded using a Gatan Orius SC1000B bottom mounted digital camera and analyzed with Gatan Digital Micrograph software (version 3.9.1).

DLS analysis

Liposome size, PDI and zeta potential were analyzed with a Brookhaven Instruments Corporation ZetaPALS Zeta Potential Analyzer. One hundred microliters of sample was diluted in PBS to a final volume of 3 mL. The samples were analyzed for size and PDI at 25°C , an angle of 90° and wavelength of 660 nm. Ten runs were performed per sample with a dust cut-off of 99.00. Zeta potential was analyzed with 5 runs per sample at 25°C .

MTT assay

LNCaP or PC3 cells were seeded at a density of 50,000 cells/well, in 1 mL DMEM into 12 well plates and left overnight to adhere for 24 h at 37°C and 5% CO₂. Following aspiration of the medium, 1 mL of serum free DMEM was added to each well. LNCaP or PC3 cells were then treated with Empty LP or Ad-HRE-E1A LP before and after the purification (P) procedure at a

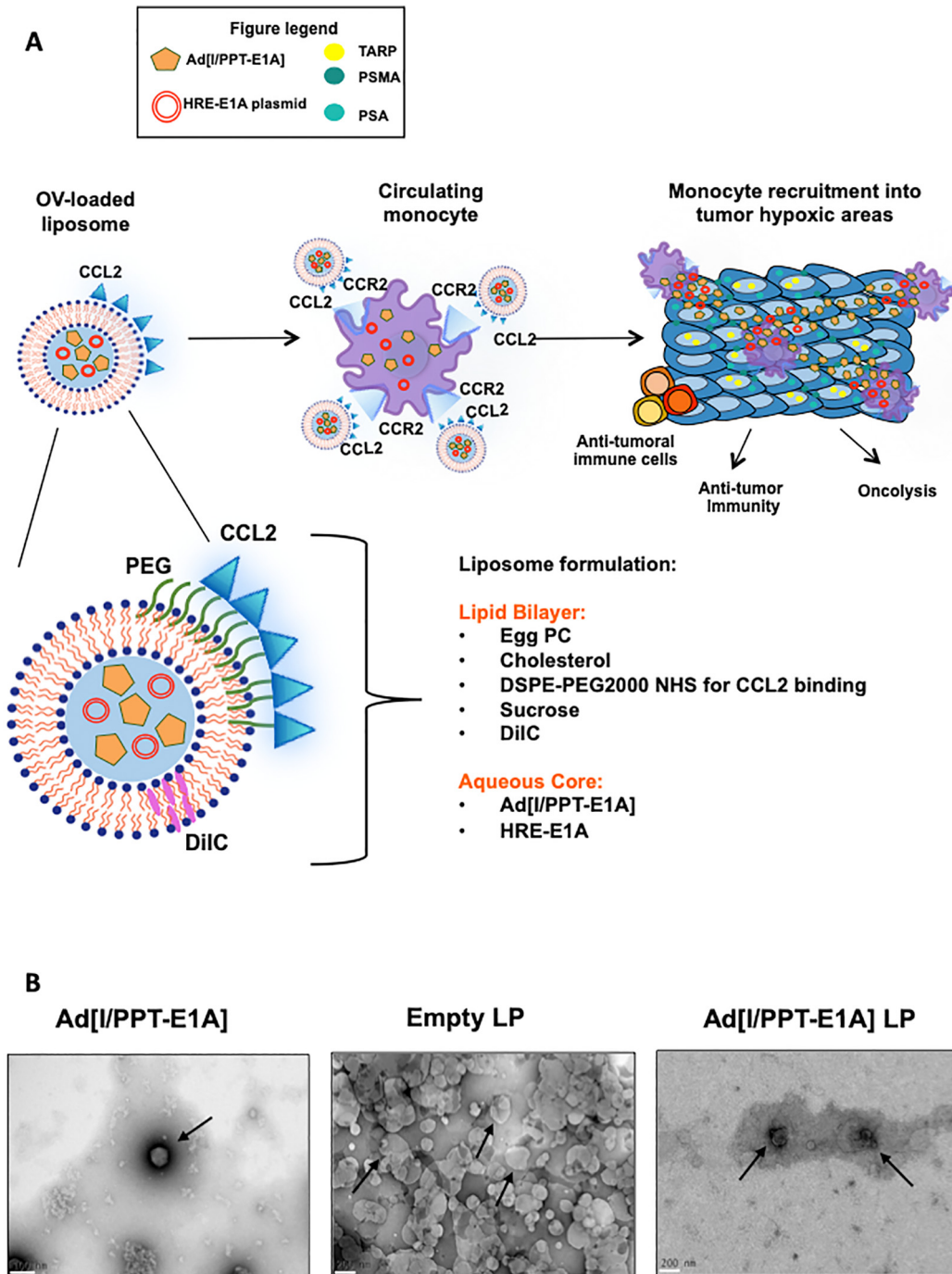


Figure 1. (A) CCL2-coated LP for the delivery of the oncolytic adenovirus Ad[PPT/E1A] directly to the prostate tumor site. The oncolytic adenovirus Ad[PPT/E1A], together with a HRE-E1A/B plasmid is encapsulated in CCL2-coated LP in order to exploit the CCR2 expression on circulating monocytes for increasing the OV efficacy upon intravenous injection. Indeed, once circulating monocytes have taken up the complexes, they are recruited to the tumor hypoxic areas where the virus can be activated by the presence of the HRE-E1A/B plasmid and can be released from the monocytes into the TME. Since Ad[I/PPT-E1A] has been genetically modified in order to have the adenovirus early region 1 (E1A) under the control of the prostate-specific antigen (PSA) enhancer, the prostate-specific membrane antigen (PSMA) enhancer and the T-cell receptor gamma-chain alternate reading frame protein (TARP) promoter, the OV can now specifically replicate and kill PC cells.¹⁵ (B) A schematic representation of our LP formulation. The figure shows the lipid bilayer made of Egg Lecithin, Cholesterol and DSPE-PEG(2000)NHS for the conjugation with the NH₂ domain of the CCL2 molecule. The hydrophobic dye DiIC was also added to track the LP. 7.5% sucrose w/v was added as a cryo-protector for the LP structure during the thawing cycles. The Ad[PPT-E1A] and the HRE-E1A plasmid were encapsulated in the aqueous core. (B) TEM pictures showing Ad[PPT-E1A] alone (scale bar 100 nm), Empty LP and Ad-HRE-E1A LP (scale bar 200 nm), respectively. Data are representative of three independent experiments.

Multiplicity of Infection (MOI) of 0.01, 0.02, 0.05, 0.075 and 0.100, with untreated cells as a negative control. After 72 h, 375 μ L of 2.5 mg/mL MTT solution in PBS was added to each well for 4 h. Subsequently, all medium was replaced with 200 μ L of DMSO for 5 min and then analyzed in a plate reader at 540 nm. Cell viability was calculated as the percentage of the absorbance compared to the untreated cells as the control.

Flow cytometry

Freshly isolated human PBMCs were immediately analyzed for the expression of different markers: CD11b PE Dazzle/594 and CD14 PercP/Cy5.5 for monocytes, CD3 APC/Cy7 for T cells, CD19 PE for B cells and CD66b AF700 for granulocytes. Each population was then analyzed for the expression of CCR2 (FITC antibody). Cells were also stained with Zombie UV™ dye (Biolegend) in order to perform the analysis described above on live cells. For the evaluation of LP uptake by human leukocytes, freshly isolated human PBMCs were incubated for 2 h with Ctrl-LP or CCL2-coated LP stained with DiD. Leukocyte subtypes were identified using the above antibodies and the % of DiD+ cells and DiD MFI were evaluated. For mouse white blood cells, the following antibody set was used: anti-mouse Alexa Fluor®700-Ly6C, anti-mouse/human Alexa Fluor®488-CD11b, anti-mouse PE-CCR2. Flow cytometry was performed using an LRSII Flow cytometer (BD Biosciences) and data analysis was performed using FlowJo software.

Mixed lymphocyte reactions

A Mixed Lymphocyte Reaction (MLR) was used to identify leukocyte activation and proliferation in an autologous reaction. Monocytes were obtained from human buffy coats and cultured in Iscove's modified Dulbecco's medium (Gibco BRL, Paisley, UK) supplemented with 2% human AB serum (Sigma, Poole, UK), penicillin (100 IU/ml), streptomycin (100 μ g/ml) and Fungizone (1.25 μ g/ml). After 2 h incubation non-adherent cells (lymphocytes) were removed and attached monocytes were treated with PBS (Control), Empty LPs, Ad[I/PPT-E1A], Ad[I/PPT-E1A] LP and Ad-HRE-E1A LP for 4 h. After which, LNCaP tumor cells (1:1 ratio with monocytes) and autologous lymphocytes (1:6 ratio with monocytes) were added to the wells and cultured in mild hypoxic (1% O₂) conditions (Muthana M. et al., 2011²⁸). Co-cultures were incubated for 24 h before analysis by flow cytometry and cytokine bead array. Flow cytometry was carried out as described above using the anti-human CD3 PE-Cy5/CD4 PE/CD8 FITC Cocktail Antibody (BioLegend).

Cytokine bead array (CBA)

After 24 h supernatants were collected from each well of the MLR. CBA was then performed to assess the expression levels of a series of cytokines. These human flex sets were obtained from BD Biosciences and included: IL-2, IL-4, IL-10, IFN- γ and TNF. Each BD™ CBA Flex Set contained two vials of Standard and one vial each of Capture Bead and PE Detection Reagent. The formularization of the Capture Bead and PE Detection Reagent components was carried out to a 50 \times concentration to

confirm product performance when multiplexed. An Attune Autosampler was used to read the samples.

Orthotopic prostate xenograft mouse model

All animal procedures were carried out in accordance with the UK Animals (Scientific Procedures) Act 1986 under the home office project license PPL70/8670 using the ARRIVE (Animal Research: Reporting of *In Vivo* Experiments) guidelines and with the approval of the University of Sheffield Ethical Committee. CD-1 nude mice anesthetized with isoflurane and 1 million LNCaP-LUC cells mixed 1:1 in Matrigel were injected into the dorsolateral prostate. Mice were divided into 4 treatment groups: PBS, Ad[I/PPT-E1A], Empty LP and Ad-HRE-E1A LP. Following 2 weeks from intraprostatic injection of LNCaP-LUC cells the first treatment was given and then 2 more treatments at day 17 and 21, respectively. After three weeks mice were sacrificed, tumors/organs harvested and embedded in OCT for immunocytochemical/histological labeling studies.

Tissue analysis

Tumors were harvested from mice after sacrifice and embedded in paraffin blocks. Ten-micrometer sections were cut using a LEICA CM1900 Cryostat at -20 °C. The sections were mounted onto slides (Thermo Scientific Superfrost Plus) with two sections mounted per tumor. The slides were fixed in acetone for 20 min at room temperature, and then flushed with PBS + 0.05% Tween (PBS-T). Sixty microliters of blocking buffer (PBS-T + 1% BSA and 5% goat serum) was added for 30 min at room temperature. Seventy microliters of anti-F4/80 (BioRad) and anti CD31 (BioLegend) was added for 1 h at room temperature. For adenovirus detection goat anti-adenovirus (Millipore) was added at concentration of 1:1000. Unbound antibody was removed by washing with PBS-T for 5 min, 3 times. A single drop of Prolong™ Gold Antifade reagent with DAPI (Thermo Fischer) was added to each slide, and a coverslip placed on top. The slides were imaged with a Life Technologies EVOS FL Auto at 20 \times magnification. DAPI, GFP and Cy5 light cubes were used to visualize DAPI, F4/80 and CD31 staining respectively. Five fields were captured per slide. The number of macrophages (F4/80 positive cells), blood vessels (CD31 positive cells) and (Adenovirus positive cells) were quantified using ImageJ software. Of note, to count perivascular macrophages only the F4/80+ TAMs sitting directly next to CD31+ tumor cells were included.

Histology

Five-micrometer paraffin wax sections from lungs were cut, dewaxed, rehydrated, and stained with hematoxylin and eosin (H&E). For detection of adenovirus in the liver tissue sections were stained with goat anti-adenovirus and visualized with DAB (Vector laboratories). The slides were then analyzed using a Leica DMI4000B inverted wide-field microscope. Metastases were counted in 5 fields per view using a 10 \times objective, and images taken in color using a 20 \times objective.

Clinical chemistry

Systemic toxicity of the virus was assessed in serum samples using a Roche Cobas 8000 analyzer at the Department of Clinical Chemistry, Royal Hallamshire Hospital, Sheffield, Teaching Hospitals NHS Trust. Alanine transaminase (ALT), aspartate transaminase (AST) and alkaline phosphatase (ALP) were measured as increases in the concentrations of these liver function tests indicate liver or muscle damage. We also measured intracellular fluids including potassium, phosphate and uric acid which are associated with the rapid release and metabolism of intracellular nucleic acids.

Statistics

All statistical analyses were performed using GraphPad Prism 7 and comparisons were made using a one-way ANOVA (unless otherwise described in the figure legends). Data are means \pm SEM and *P* values of less than 0.05 were considered to be significant.

Results

Encapsulation of the oncolytic Ad[I/PPT-E1A] in CCL2-coated LP

Use of OV's in the clinic remains a challenge as intravenous injection of these agents is associated with poor efficacy due to their clearance by phagocytic cells or their neutralization by antibodies in the blood stream.³³ To avoid this problem and thus to enhance OV efficacy upon intravenous administration, we attempted to encapsulate the Ad[PPT/E1A], together with a HRE-E1A/B plasmid, in CCL2-coated liposomes (Ad-HRE-E1A LP) as shown in Figure 1, A. This allows the virus to be taken up by CCR2-expressing circulating monocytes that act as a "Trojan Horse" for OV delivery to hypoxic tumor areas, where monocytes are recruited.^{25–27,34} Ad-HRE-E1A LP and Empty LPs (used as a control) were synthesized using a film hydration method. Of note, LPs with Ad[PPT/E1A] only were not produced since our group has already demonstrated that the virus without the plasmid is ineffective when delivered by monocytes/macrophages.^{28,29} First, LPs were characterized for their size and z-potential by DLS measurement and TEM analysis. Our data showed that LP purification upon ultracentrifugation and immunoprecipitation, to remove un-encapsulated molecules, resulted in reduced particle size between 271 and 281 nm, which is very close to the expected range (200–300 nm) based on our LP formulation (Table 1). This is also the size range we aimed to achieve in order to meet two important criteria: the encapsulation of our OV typically 90–100 nm (Figure 1, B), and the generation of LP with a size range that reduces the chances of OV clearance from the blood stream^{10,35} and increases LP uptake by monocytes.³⁶ Interestingly, DLS and TEM data showed different results in terms of OV size: from the DLS analysis the OV size detected is 217.9 nm while from TEM pictures the size is around 90–100 nm, as expected. This difference could be explained by the fact that DLS measures the hydrodynamic size that is defined as "the size of a hypothetical hard sphere that diffuses in the same fashion as that of the particle being measured."³⁷ Since the virus does not have a

Table 1

Liposome characterization. DLS data showing the size, the PDI and the z-potential of Ad[I/PPT-E1A] and LP after their purification (P) through ultracentrifugation and immunoprecipitation. Ten runs per sample were performed to calculate the size and PDI value, while 5 runs per sample were performed to calculate the z-potential.

DLS measurement	Size (nm)	PDI	z-potential (mV)
Ad-HRE-E1A	217.9	0.255	−7.65
Empty LP −P	417.0	0.613	−9.80
Empty LP +P	271.3	0.283	−30.92
Ad-HRE-E1A LP −P	378.6	4.432	−12.30
Ad-HRE-E1A LP +P	280.9	0.237	−26.68

spherical shape, this could explain the higher OV size we measured by the DLS compared to the expected size that was, in any case, confirmed by the TEM images. More importantly, TEM pictures confirmed DLS data in terms of LP size and revealed that the naked Ad had a characteristic icosahedral shape (red arrow in the first TEM picture in Figure 1, B); in contrast, the Ad-HRE-E1A-loaded complexes had a rough surface structure (red arrows in the third TEM picture in Figure 1, B), suggesting that the Ad particles were completely encapsulated inside the LP (Figure 1, B). From the images a single virus particle appears to be encapsulated. Empty liposomes are shown by red arrows in the second picture in Figure 1, B. As per DLS measurement, the Polydispersity Index (PDI) value is strongly reduced upon LP purification (Table 1), indicating that our final LPs are a homogeneous population in terms of size range, probably due to the removal of un-encapsulated molecules, especially un-encapsulated Ad[PPT/E1A] which, with its large size, can easily increase the particle heterogeneity. Moreover, upon LP purification, DLS analysis showed that our particles have a negative z-potential, between −26 mV and −31 mV that was expected based on our LP formulation (Table 1). The reduction in the z-potential value after liposome purification is probably due to the removal of un-encapsulated CCL2 and free OV's. These results suggest that using this LP formulation could be a promising strategy for the encapsulation of OV's inside liposomal particles.

CCL2-coated LPs are preferentially taken up by circulating CCR2-expressing monocytes

In the attempt to evaluate CCL2-coated LP uptake by circulating monocytes, we firstly checked the expression of CCR2 on circulating human leukocytes. Our flow cytometry data showed that among all the leukocytes, monocytes have the highest CCR2 expression (Supplementary Figure 1, A). Indeed, 96.6% of CD11b + CD14+ cells express CCR2, while only 6.22% of CD3+ T cells, 1.87% of CD19+ B cells and 8.65% of CD66b granulocytes are CCR2 positive. Similar results were also obtained in mouse monocytes where 88.8% of Ly6C + CD11b + double positive cells express CCR2 (Supplementary Figure 1, B). Moreover, based on this evidence, we also demonstrated that upon incubation of human PBMCs with Ctr-LP or CCL2-coated LP for 2 h, monocytes showed increased uptake of CCL2-coated LP compared to lymphocytes and granulocytes (Figure 2, A). In particular, this was

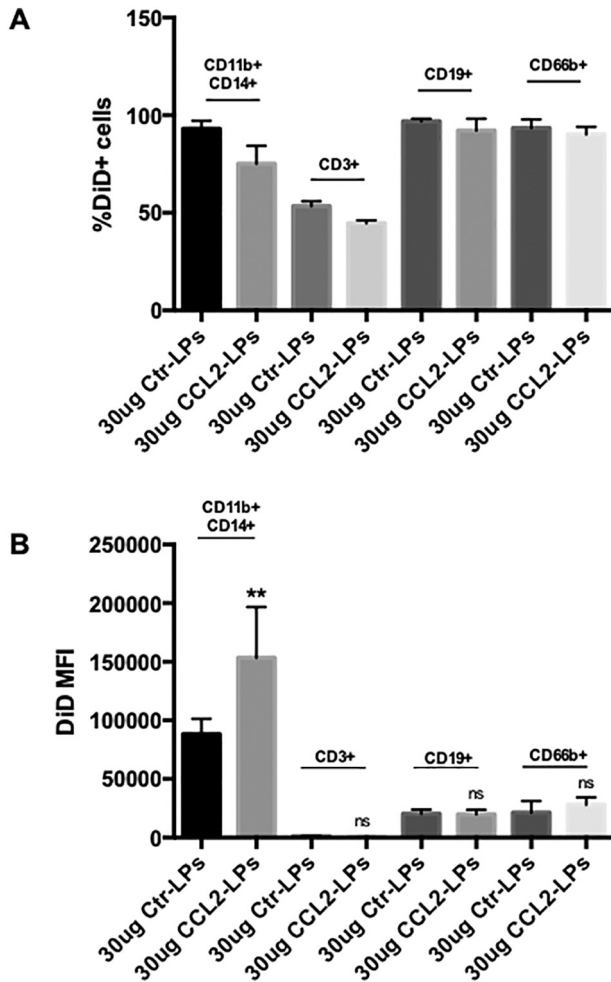


Figure 2. CCL2-coated LP uptake by human leukocytes. Human PBMCs were isolated from adult blood buffy coats and then incubated for 2 h with Ctr-LP or CCL2-coated LP stained with DiD. LP uptake by human leukocytes was assessed by flow cytometry. Live cells were gated by using Zombie UV dye and then human monocytes were identified as CD11b and CD14 double positive cells; T cells were identified as CD3+ cells, B cells as CD19+ cells and granulocytes were identified as CD66+ cells. (A) %DiD+ in monocytes, T cells, B cells and granulocytes. (B) DiD MFI in monocytes, T cells, B cells and granulocytes. Data are representative of three independent experiments. *P* values were calculated using ANOVA. ** indicates *P* values of <0.01. Error bars indicate SEM.

clear when we looked at the DiD MFI in CD11b + CD14+ cells compared to the other leukocytes (Figure 2, B). Interestingly, monocytes also take up a high amount of Ctr-LP, probably due to their intrinsic phagocytic ability. However, the mean fluorescence intensity of expression of CCL2-coated LP taken up by these cells is significantly higher compared to Ctr-LP (Figure 2, B). These results are important because our aim is to specifically target circulating monocytes for the delivery of OV-loaded LP to the tumors.

Ad-HRE-E1A LP effectively kills prostate cancer cells

Following LP purification and characterization, it was important to calculate the concentration of virus for further *in vitro* and *in vivo* analysis. Figure 3, A shows the infectious units

(ifu) per mL of solution calculated for Ad[PPT/E1A] and Ad-HRE-E1A LP before and after the purification assessed using the Adenovirus rapid titer kit: the titer reflects the number of virus particles and not the number of liposomes, but based on our TEM images, only one Adenovirus has been encapsulated in one LP. Our data showed that the virus concentration inside the LP is much lower than the Ad[I/PPT-E1A] stock concentration. This could be related to the fact that during the encapsulation procedure, the Ad undergoes harsh conditions such as the presence of high Chloroform concentrations and exposure to high temperatures that damage the virus structure and viability. On the other hand, there was no significant difference in the number of viral particles inside LPs before and after the purification (–P and +P) process, suggesting that almost all the Ad[I/PPT-E1A] was successfully encapsulated (Figure 3, A). Indeed, purification of our liposome was carried out in order to get purified samples and deplete all the un-encapsulated adenovirus particles for our subsequent *in vitro* and *in vivo* experiments. Otherwise, samples contaminated with free Adenovirus could strongly affect our results and it would have been difficult to assess if any therapeutic effects were resulting from the virus or virus encapsulated in the liposomes.

Despite the reduction in the number of Ad particles in our Ad-HRE-E1A LPs compared to the virus stock, encapsulated-Ad shows high efficacy in reducing LNCaP cell viability after 72 h, as shown by the MTT assay (Figure 3, B). Indeed, treatment with non-purified Ad-HRE-E1A LP (–P) at MOI 0.075 and 0.1 decreases LNCaP cell viability to 69% ($P < 0.0001$) and 93.84% ($P < 0.0001$), respectively. Accordingly, treatment with purified Ad-HRE-E1A LP (+P) at MOI 0.075 and 0.1 decreases cell viability to 49.41% ($P < 0.0001$) and 79.87% ($P < 0.0001$), respectively. This difference between the virus efficacy in killing PC cells in the purified vs. un-purified formulation could be due to the removal of residual un-encapsulated OVs from the solution upon the purification process. Interestingly, the Empty LPs show no toxicity on LNCaP cells, suggesting that LPs can be safely used for the delivery of OVs or other drugs/agents (Supplementary Figure 2, A). We further demonstrated efficacy of our encapsulated virus in PC3 cells where a significant decrease in cell viability was noted at MOI 0.075 and 0.1 and no toxicity was observed with the Empty LPs (Supplementary Figure 2, B). Prostate specific killing activity of un-encapsulated Ad[I/PPT-E1A] has already been demonstrated^{15,30} and we have confirmed prostate tumor oncolysis and specificity (Supplementary Figure 3). Taken together, these results show that our attempt to load LP with Ad[I/PPT-E1A] was successful as the OV still retains its ability to kill prostate cancer cells after the encapsulation procedure. Furthermore, from our data we can see that the Ad[I/PPT-E1A] encapsulated in LP shows better killing at low MOIs compared to the virus alone.

HRE-E1A/B plasmid is necessary for Ad successful LNCaP targeting and tumor cell death

As already reported in our previous work from Muthana M. et al, 2011,²⁸ the absence of HRE-E1A/B plasmid reduces the killing of LNCaP cells both *in vitro* and *in vivo*, suggesting that the plasmid is necessary for successful tumor targeting and tumor cell death. For this reason, we did not include the group Ad[I/

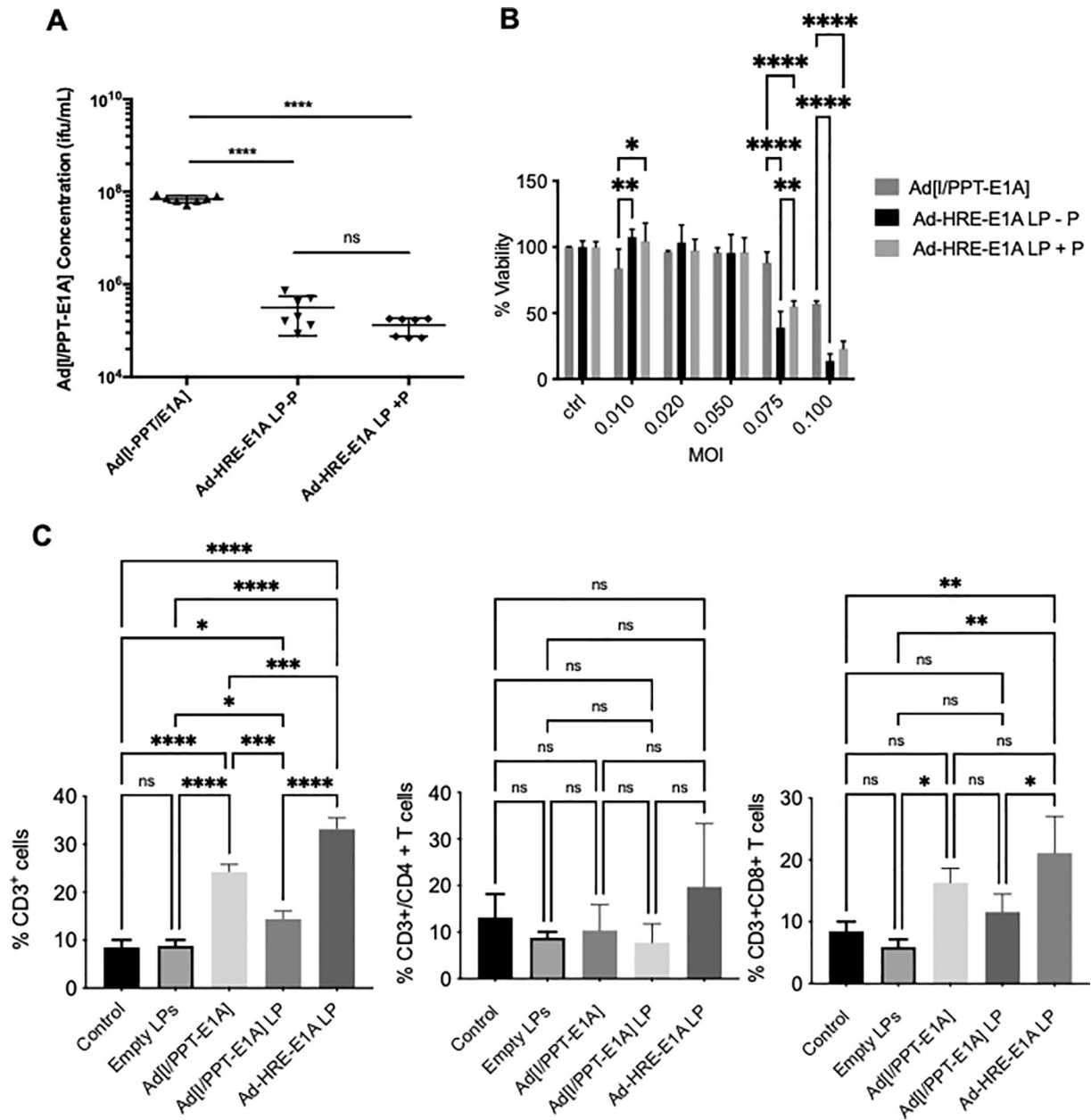
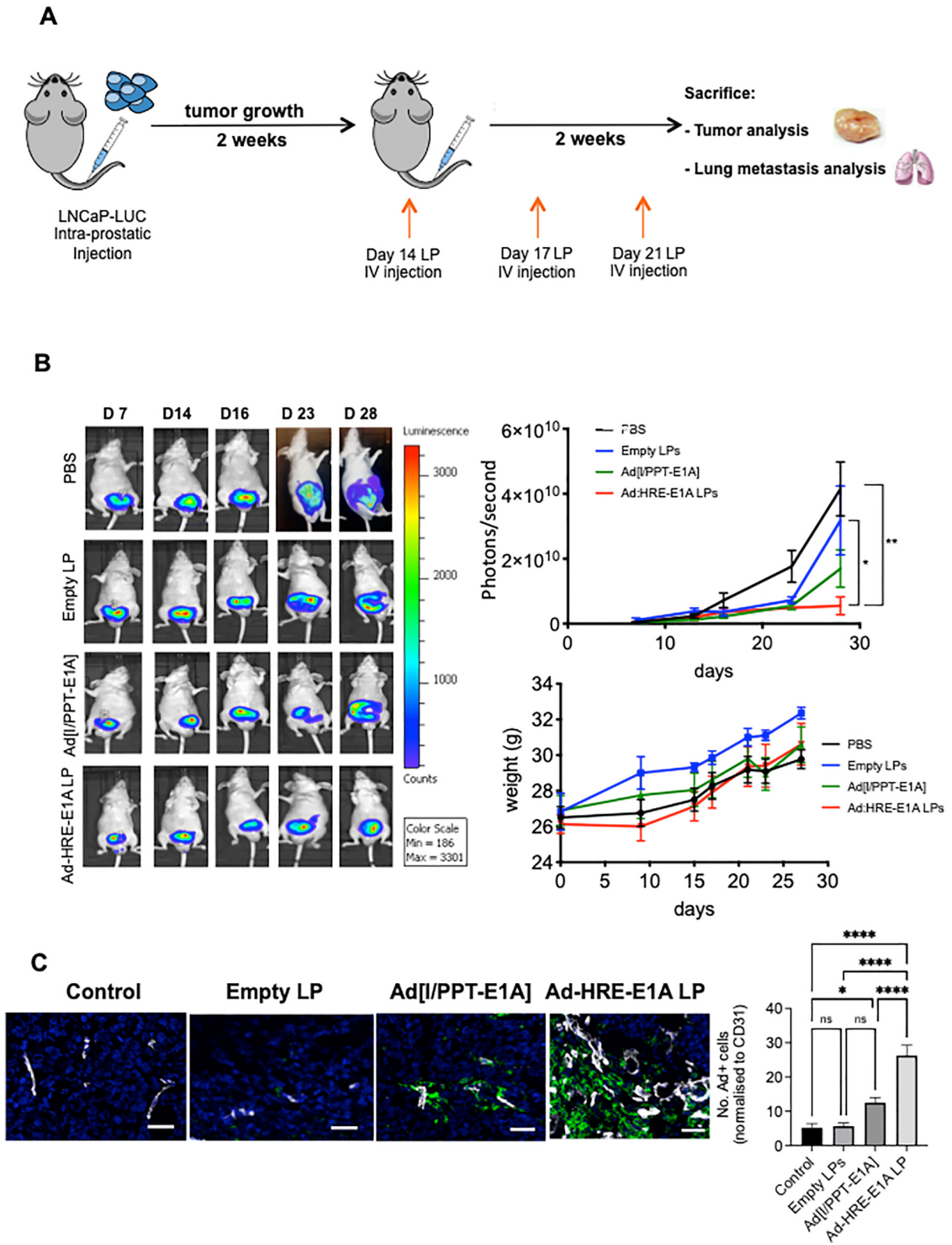


Figure 3. Ad[I/PPT-E1A] titration and assessment of LNCaP cell viability after Ad-HRE-E1A LP treatment *in vitro*. (A) Viral particle quantification by using the Adeno-X™ Rapid Titre Kit. The graph shows the infectious units (ifu) per mL of solution calculated for the Ad[I/PPT-E1A], Ad-HRE-E1A LP-P and the Ad-HRE-E1A LP+P ($n=3$). MTT assay showing cell viability after 72 h of treatment with (B) Ad-HRE-E1A LP. LNCaP cells were treated with MOI 0.01, 0.02, 0.05, 0.075, or 0.100 and cell viability was compared to untreated cells (ctrl). (C) Mixed lymphocyte reaction (MLR) was performed: freshly isolated monocytes were treated with PBS (Control), Empty LPs, Ad[I/PPT-E1A], Ad[I/PPT-E1A] LP and Ad-HRE-E1A LP and then cultured with tumor cells (1:1 ratio with monocytes) and autologous lymphocytes (1:6 ratio with monocytes), in mild hypoxic conditions. Flow cytometry analysis for evaluating the expression of CD3+, CD4+ and CD8+ cells was carried out. The graphs show the percentage of CD3+ cells, the percentage of CD4+ cells normalized on the % of CD3+ cells and the % of CD8+ cells normalized on the % of CD3+ cells. Data are representative of three independent experiments. P values were calculated using ANOVA test. * indicates P values of <0.05, ** indicates P values of <0.01, *** indicates P values of 0.005 and **** indicates P values of <0.0001. Error bars indicate SEM.

PPT-E1A] LPs without the HRE-E1A/E1B plasmid in our *in vivo* studies. However, in support of this we assessed the effects of using liposomes loaded with and without the HRE-E1A/E1B plasmid in a mixed lymphocyte reaction whereby monocytes were incubated with PBS (Control), Empty LP, Ad[I/PPT-E1A] (virus only), Ad[I/PPT-E1A] LP (no HRE-E1A/E1B plasmid) and Ad-HRE-E1A LP (plasmid and virus) in mild

hypoxic conditions and then co-cultured with tumor cells and autologous lymphocytes. From this we have assessed T cell activation and cytokine expression. These data demonstrate that CD3 and CD8 expansion is significantly improved in the presence of Ad[I/PPT-E1A] alone or with liposomes containing the plasmid HRE-E1A/B compared to untreated cells, empty liposomes or liposomes just containing the Ad[I/PPT-E1A]



(Figure 3, C). This suggests that the plasmid is needed for successful viral replication in monocytes in hypoxic conditions. These data were also supported by cytokine analysis of the

mixed cultures using cytokine bead arrays. Here we found that the liposomes containing the Ad[I/PPT-E1A] and plasmid HRE-E1A/B were as effective as Ad[I/PPT-E1A] alone at promoting

the production of inflammatory cytokines IFN γ , TNF α and IL-2 (T cell activation markers³⁸) in these mixed cultures (Supplementary Figure 4).

Ad-HRE-E1A LP reduces prostate tumor growth and pulmonary metastases

Once we had confirmed the Ad-HRE-E1A LP *in vitro* therapeutic efficacy, we aimed to evaluate whether the intravenous delivery of Ad[I/PPT-E1A] loaded LP could reduce tumor growth in prostate cancer bearing mice. Thus, we established an orthotopic prostate xenograft mouse model by the injection of LNCaP-LUC cells into the dorsolateral portion of the prostate gland of male CD1 athymic mice (Figure 4, A). After two weeks mice received intravenous injection of three doses of PBS, Ad[I/PPT-E1A] at 1×10^8 PFU, Empty LP (100 μ L of 10 mg/mL LP) or Ad-HRE-E1A LP (100 μ L of 10 mg/mL LP solution containing 1×10^5 PFU Ad). As shown in Figure 4, B, since the first *i.v* injection, mice treated with Ad[I/PPT-E1A] or Ad-HRE-E1A LP showed a delay in tumor growth compared to the mice treated with PBS. Mice treated with Empty LP also showed a trend towards a delay in tumor growth compared to the PBS treatment groups; however, after the third *i.v* injection, tumor growth accelerated quickly in this group. Importantly, none of the treatments induced weight loss in the mice (Figure 4, B). Treatment with Ad-HRE-E1A LP was more effective than the injection of Ad[I/PPT-E1A], and almost a 1000-fold less virus was administered compared to virus alone, suggesting that the adenovirus encapsulation in LP could be an effective strategy to increase OV efficacy in accumulating into the tumor site and thus, in increasing its efficacy. This was also confirmed by the immunofluorescence staining (Figure 4, C). Here we show that using our liposome loaded adenovirus resulted in significantly more virus detected in the tumor tissue compared to the injection of Ad[I/PPT-E1A] alone, with a preferential presence of the virus near blood vessels where circulating monocytes come from. In addition, we were only able to detect low numbers of virus positive cells (less than 1%) in livers of these mice and no significant differences were detected between groups (Supplementary Figure 5). Some background staining is seen even after extensive blocking. However, liver staining of mice treated with free Ad or Ad-HRE-E1A LP doesn't show higher Ad staining compared to untreated mice. We also performed some clinical toxicology in serum samples to detect alkaline phosphatase, alanine aminotransferase, aspartate aminotransferase, calcium, potassium, phosphate and uric acid. These data highlighted that Ad [I/PPT-E1A] delivered *via* liposomes may actually prevent upregulation of alkaline phosphatase compared to adenovirus alone by protecting the virus in circulation and thus reducing

toxicity (Supplementary Figure 6). The other markers were below the threshold of detection or did not differ significantly between groups. Together, these data indicate there was no treatment-induced toxicity.

Furthermore, changes in the TME were assessed post-mortem. Interestingly, our data showed that number of blood vessels was significantly reduced upon *i.v* injection of our OV-loaded LP (Ad-HRE-E1A LP). Recent studies have already shown that oncolytic adenovirus can attack the tumor vasculature (9,29). In addition, the number of F4/80+ cells was significantly reduced upon treatment with Ad-HRE-E1A LP compared to the other treatments (Figure 5, A). TAMs are known to support tumor growth and metastasis (39,40) and using liposome-assisted delivery of an OV maybe a way to target these cells.

Interestingly, our confocal pictures showed that F4/80+ cells mainly localized near to the blood vessels, suggesting they are perivascular macrophages. These cells have been shown to have a pro-tumoral role supporting angiogenesis and promoting tumor metastasis and their presence has recently been reported in human prostate tumors.³⁹⁻⁴¹ Targeting these cells using our Ad-HRE-E1A LP could add significant therapeutic benefit.

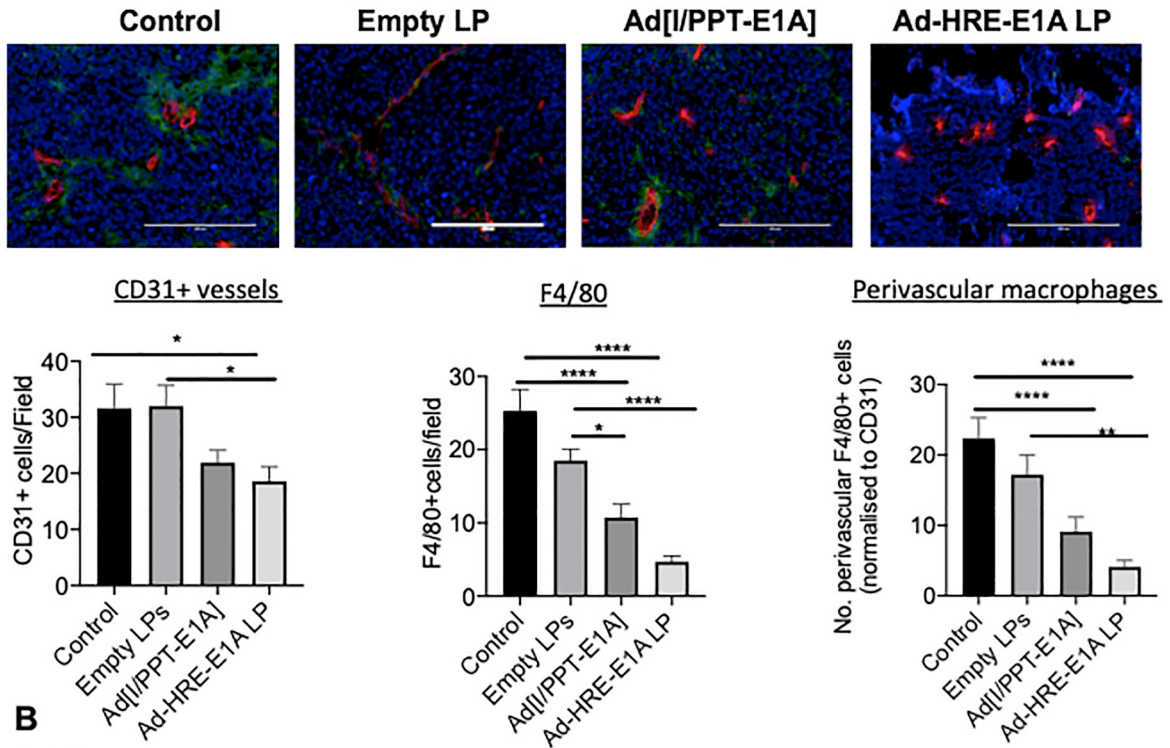
Next, we assessed whether Ad-HRE-E1A LP administration reduced the number of lung metastasis in our mice. Our H&E staining showed that there was a significant decrease in the number of pulmonary metastasis upon Ad-HRE-E1A LP administration compared to all the other treatments (Figure 5, B). These results support the idea that the encapsulation of our OV in CCL2-coated LP is a promising strategy to increase the therapeutic efficacy of the virus, due to its ability to kill prostate cancer cells, but also in shaping the surrounding tumor microenvironment by reducing the number of perivascular macrophages and thus, decreasing their chance to support cancer cell metastasis.

Discussion

The use of nanomedicine has gained attention as it offers a platform for the delivery of different immunotherapeutic agents specifically to the tumor site making nanoparticles a promising platform for increasing immunotherapy efficacy and reducing unwanted toxicity.^{10,42,43} We have previously shown that macrophages co-transduced with a hypoxia-regulated E1A/B plasmid and Ad[I/PPT-E1A] adenovirus, upon injection into tumor-bearing mice, protected the virus from its clearance into the blood system and delivered it to tumors. Once inside hypoxic tumor areas, E1A/B proteins were expressed by the co-transduced macrophage, activating replication of the adenovirus within prostate tumor cells. This resulted in the inhibition of both primary tumor growth and the formation of pulmonary metastases.^{28,29} However, the use of

Figure 4. Ad-HRE-E1A LP reduces prostate tumor growth. (A) Schematic representation of our orthotopic prostate xenograft mouse model. Male CD-1 athymic mice were implanted with LNCaP-LUC cells into the dorsolateral portion of the prostate gland and received 3 doses of intravenous (IV) PBS, Empty LPs, Ad[I/PPT-E1A] or Ad-HRE-E1A-loaded LPs. (B) IVIS imaging of LNCaP-LUC tumors from Day 7 to Day 28 after tumor implantation and bioluminescent signals quantified using the IVIS imaging system. Mice were divided in four groups: PBS, Ad[I/PPT-E1A], Empty LP and Ad-HRE-E1A LP with $n = 4-8$ mice per group. The weights of the mice treated with PBS, Ad[I/PPT-E1A], Empty LP and Ad-HRE-E1A LP are also displayed at several time points: 9, 13, 15, 17, 21, 23 and 27 days. The arrows indicate when the different treatments were performed.(C) Immunofluorescence staining for adenovirus (E1A) in tumor sections harvested from our orthotopic prostate xenograft mouse model treated with PBS (Control), Empty LP, Ad[I/PPT-E1A] and Ad-HRE-E1A LP $n = 4$. The slides were stained with DAPI (blue) and fluorescently labeled anti-CD31 (white) and anti-E1A (green) antibodies. Five fields per view taken per slide. The graph shows the number of Ad-positive cells normalized to CD31+ cells, for each treatment group.* indicates P value of <0.05 , ** indicates P value of <0.01 , **** indicates P value of <0.0001 . Error bars indicate SEM.

A



B

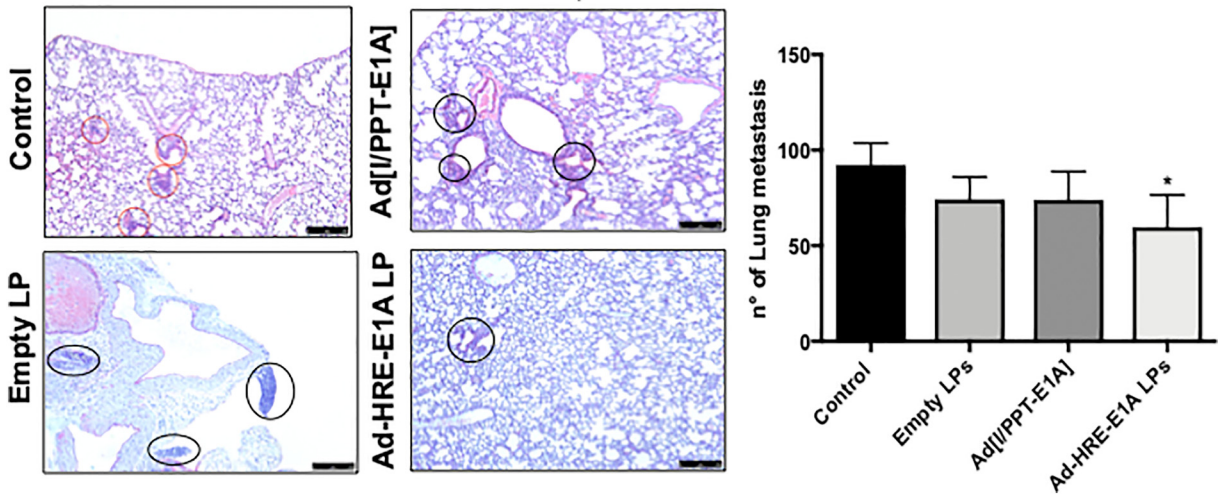


Figure 5. OV-loaded LP reduce TAMs and pulmonary metastasis. (A) Tumor sections showing the presence of macrophages within the tumor microenvironment. Tumors were harvested from an orthotopic prostate xenograft mouse model treated with PBS, Ad[I/PPT-E1A], Empty LP and Ad-HRE-E1A LP $n = 4$. The slides were stained with DAPI (blue) and fluorescently labeled anti-CD31 (red) and anti-F4/80 (green) antibodies. Five fields per view taken per slide. (B) H&E stained mouse lung cross-sections were stained with H&E and mounted onto slides and imaged with a Leica DMI4000B inverted wide-field microscope. The graph shows the number of pulmonary metastasis per field for each treatment group. Data are mean \pm SEM and P values were calculated using ANOVA. ** indicates P values of <0.01 . Scale bar = 50 μm .

nanoparticles could be an easier and more practical alternative for targeting viruses to tumors^{10,17} and other groups have demonstrated encouraging results for the treatment of colon and hepatocellular carcinoma by OV liposomal encapsulation.^{44,45} Here, we show a successful method to encapsulate an oncolytic adenovirus Ad[I/PPT-E1A] into CCL2-coated LP for intravenous targeting of monocytes

and delivery *via* these cells to prostate tumors. Importantly, our encapsulation procedure does not interfere with OV killing activity of prostate cancer cells *in vitro* and *in vivo*. In our prostate cancer-bearing mice, a 1000-fold less virus is used in our nanomedicine formulation compared to OV alone, resulting in a reduction in tumor size, TAMs and lung metastasis.

Among the many types of nanoparticles, we decided to encapsulate our OV into LP as they show low toxicity since they are composed of naturally occurring phospholipids, making them biologically unreactive and indistinguishably immunogenic. Moreover, by mimicking the cell membrane, LPs possess an aqueous core to encapsulate hydrophilic solutes, allowing them to be easily internalized by cells through endocytosis or plasma membrane fusion, and a lipid bilayer to entrap hydrophobic substances, so that LP can carry both hydrophilic and hydrophobic drugs.^{10,46,47} Indeed, in this regard, in 1995 the liposome-encapsulated form of Doxorubicin (Doxil) was approved by the FDA for the treatment of ovarian cancer and AIDS-related Kaposi's sarcoma and this success paved the way for the use of LP for the delivery of several different drugs/agents also in the field of cancer immunotherapy.^{10,46} Moreover, liposomes are very attractive to cells and are known to enhance drug delivery.⁴⁸

Based on all these considerations, it would be interesting to evaluate whether we can get similar results in terms of successful OV encapsulation and efficacy *in vitro* and *in vivo* using different LP formulations (e.g. natural or synthetic phospholipids, the phospholipids:cholesterol ratio and the dye used) or even different types of nanoparticles.

In particular, we carefully studied the most suitable liposome formulation to boost the efficacy of our OV treatment. In particular, we used negatively charged liposomes because, when administered *in vivo*, cationic formulations interact with a range of proteins within the biological milieu and their positive charge is rapidly neutralized and often a depot is formed at the site of injection.⁴⁹ Within our current studies, we were looking to circumvent electrostatic interactions with the virus, biological proteins after administration and also to create larger vesicles able to incorporate the virus. Our formulation includes polyethylene glycol (PEG) for increasing the liposome blood circulation time in order to avoid their recognition by the immune system.⁵⁰ This is the first time this formulation has been used for a biological therapy. Furthermore, NHS reacts with amine groups in proteins at basic pH, which allows the conjugation of CCL2 with PEGylated lipids, and the sucrose as a cryoprotector for the OV that needed to be stored at -80°C . Moreover, we carefully adjusted the film hydration method to be sure our Ad[I/PPT-E1A] was not damaged by high temperature and high chloroform concentration. We confirmed the efficacy of our Ad-HRE-E1A LP in prostate cancer models, *in vitro* and *in vivo*. We used LNCaP cells as our Ad[I/PPT-E1A] only replicates in prostate cancer cells expressing PSA, PSMA and TARP.^{15,30} LNCaP cells have a low metastatic potential and while we could not see tumor metastasis from our IVIS images, small pulmonary metastases were abundant in the mouse lungs in the post-mortem analysis, which is typical of this model.²⁹ Moreover, even if prostate cancer cells can express CCR2, especially if aggressive, LNCaPs are known to have low CCR2 expression and this is also why we used this model.⁵¹ It would be interesting to investigate the use of our Ad-loaded LP in more aggressive PC models and in the metastatic setting.

We used nude mice for the implantation of human cancer cells in our mouse PC model, since adenoviruses are known to replicate poorly in murine cells.^{52–54} This limited our analysis to

innate immune cells (reduction of the number of macrophages within tumors) without any possibility to evaluate the impact on other important immune subsets such as T cells, dendritic cells, natural killer cells and myeloid derived suppressive cells (MDSCs) that would have been present in tumors and are considered a hallmark of cancer.^{55–58} Future work should focus on repeating these studies with viruses that are able to replicate in murine prostate cancer cells so that a fuller picture of the TME post-treatment is determined. Nevertheless, our results showed that the encapsulation of the oncolytic Ad[I/PPT-E1A] in CCL2-coated LP is a promising strategy to reduce the number of TAMs that are mainly localized near to the blood vessels, suggesting that there is a decrease in the number of perivascular macrophages, reducing their chance of supporting cancer cell metastasis. Further experiments to test this hypothesis are needed in order to check the expression of specific perivascular macrophages markers within the TME.

In summary, CCL2-coated LPs loaded with the oncolytic Ad[I/PPT-E1A] have been successfully prepared for the first time and shown to specifically target circulating monocytes. Moreover, OV encapsulation does not interfere with the virus killing activity of prostate cancer cells *in vitro* and we have also shown promising data *in vivo*. These results are an important contribution to the field of cancer immunotherapy: indeed, the use of liposome-assisted delivery of OVs has the potential to overcome the challenges of systemic delivery and reducing viral load, making this approach a promising strategy for targeting OVs to inaccessible cancers.

Data availability

The authors declare that all data supporting this study are available within the manuscript or can be obtained from the authors upon request.

Conflict of interest

The authors declare no conflict of interests.

Acknowledgment

We acknowledge that funding for this work was provided by the European Commission under a 516 MSCA-ITN award, grant number 675743 (ISPIC) and the European Union's Horizon 2020 research 517 and innovation programme under the Marie-Curie grant agreement no 872860. Cancer Research UK (CRUK grant reference: C25574/A24321).

Appendix A. Supplementary data

Supplementary data to this article can be found online at <https://doi.org/10.1016/j.nano.2021.102506>.

References

1. Bray F, Ferlay J, Soerjomataram I, Siegel RL, Torre LA, 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. <https://doi.org/10.3322/caac.21492>.

2. Wang L, Ning J, Wakimoto H, Wu S, Wu CL, Humphrey MR, et al. Oncolytic herpes simplex virus and PI3K inhibitor BKM120 synergize to promote killing of prostate cancer stem-like cells. *Mol Ther Oncolytics* 2019;**29**(13):58-66, <https://doi.org/10.1016/j.omto.2019.03.008>.
3. Prashanth R. Epidemiology of prostate cancer. *World. J Oncol* 2019;**10**(2):63-89, <https://doi.org/10.14740/wjon1191>.
4. J. E.M. Ferlay, M. Colombet, I. Soerjomataram, C. Mathers, D.M. Parkin, M. Pineros, A. Znaor, F. Bray. Estimating the global cancer incidence and mortality in 2018: GLOBOCAN sources and methods. *Int J Cancer* 2019;**144**(8):1941-1953. <https://doi.org/10.1002/ijc.31937>.
5. Attard G, Parker C, Eeles RA, Schröder F, Tomlins SA, Tannock I, et al. Prostate cancer. *Lancet* 2016;**387**:70-82, [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(14\)61947-4](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(14)61947-4).
6. Litwin MS, Tan HJ. The diagnosis and treatment of prostate cancer: a review. *JAMA* 2017;**317**(24):2532-42, <https://doi.org/10.1001/jama.2017.7248>.
7. Huang Y, Jiang X, Liang X, Jiang G. Molecular and cellular mechanisms of castration resistant prostate cancer. *In Oncol Lett* 2018;**6**:6063-76, <https://doi.org/10.3892/ol.2018.8123>.
8. Zhang W, Meng Y, Liu N, Wen XF, Yang T. Insights into chemoresistance of prostate cancer. *In. Int J Biol Sci* 2015;**11**:160-70, <https://doi.org/10.7150/ijbs.11439>.
9. Lee P, Gujar S. Potentiating prostate cancer immunotherapy with oncolytic viruses. *Nature reviews. Urology* 2018;**15**:235-50, <https://doi.org/10.1038/nrurol.2018.10>.
10. Iscaro A, Howard NF, Muthana M. Nanoparticles: properties and application in cancer immunotherapy. *Curr Pharm Des* 2019;**25**(17):1962-79 (18) <https://doi.org/10.2174/1381612825666190708214240>.
11. Di Lorenzo G, Buonerba C, Kantoff PW. Immunotherapy for the treatment of prostate cancer. *Nat Rev Clin Oncol* 2011;**8**:551-61, <https://doi.org/10.1038/nrclinonc.2011.72>.
12. Drake CG. Prostate cancer as a model for tumor immunotherapy. *Nat Rev Immunol* 2010;**10**:580-93, <https://doi.org/10.1038/nri2817>.
13. Russel JS, Peng KW, Bell JC. Oncolytic virotherapy. *Nat Biotechnol* 2012;**30**:658-70, <https://doi.org/10.1038/nbt.2287>.
14. Fukuhara H, Ino Y, Todo T. Oncolytic virus therapy: a new era of cancer treatment at dawn. *Cancer Sci* 2016;**107**(10):1373-9, <https://doi.org/10.1111/cas.13027>.
15. Schenk E, Essand M, Kraaij R, Adamson R, Maitland NJ, Bangma CH. Preclinical safety assessment of Ad[IPPT-E1A], a novel oncolytic adenovirus for prostate cancer. *Hum Gene Ther Clin Dev* 2014;**25**(1):7-15, <https://doi.org/10.1089/humc.2013.181>.
16. Bommarreddy PK, Shettigar M, Kaufman HL. Integrating oncolytic viruses in combination cancer immunotherapy. *Nat Rev Immunol* 2018;**18**(8):498-513, <https://doi.org/10.1038/s41577-018-0014-6>.
17. Howard F, Muthana M. Designer nanocarriers for navigating the systemic delivery of oncolytic viruses. *Nanomedicine (Lond)* 2020;**15**(1):93-110, <https://doi.org/10.2217/nmm-2019-0323>.
18. Lawler SE, Speranza MC, Cho CF, Chiocca EA. Oncolytic viruses in cancer treatment: a review. *JAMA Oncol* 2017;**3**(6):841-9, <https://doi.org/10.1001/jamaoncol.2016.2064>.
19. Freytag SO, Khil M, Stricker H, Peabody J, Menon M, DePeralta-Venturina M, et al. Phase I study of replication-competent adenovirus-mediated double suicide gene therapy for the treatment of locally recurrent prostate cancer. *Cancer Res* 2002;**62**:4968-76.
20. Boettcher AN, Usman A, Morgans A, Weele DJV, Sosman J, Wu JD. Past, current, and future of immunotherapies for prostate cancer. *Front. Oncologia* 2019;**9**:884, <https://doi.org/10.3389/fonc.2019.00884>.
21. Freytag SO, Movsas B, Aref I, Stricker H, Peabody J, Pegg J, et al. Phase I trial of replication-competent adenovirus-mediated suicide gene therapy combined with IMRT for prostate cancer. *Mol Ther* 2007;**15**:1016-23, <https://doi.org/10.1038/mt.sj.6300120>.
22. Papaioannou NE, Beniata OV, Vitsos P, Tsitsilonis O, Samara P. Harnessing the immune system to improve cancer therapy. *Ann Transl Med* 2016;**4**(14):261, <https://doi.org/10.21037/atm.2016.04.01>.
23. Farkona S, Diamandis EP, Blasutig IM. Cancer immunotherapy: the beginning of the end of cancer? *BMC Med* 2016;**14**:73, <https://doi.org/10.1186/s12916-016-0623-5>.
24. Murray PJ, Wynn TA. Protective and pathogenic functions of macrophage subsets. *Nat Rev Immunol* 2011;**11**:723-37. [10.1038/nri3073](https://doi.org/10.1038/nri3073).
25. Qian BZ, Li J, Zhang H, Kitamura T, Zhang J, Campion LR, Kaiser EA, Snyder LA, Pollard JW. CCL2 recruits inflammatory monocytes to facilitate breast-tumor metastasis. *Nature* 2011;**475**:222-5. [10.1038/nature10138](https://doi.org/10.1038/nature10138).
26. Leek RD, Landers RJ, Harris AL, Lewis CE. Necrosis correlates with high vascular density and focal macrophage infiltration in invasive carcinoma of the breast. *Br J Cancer* 1999;**79**:991-5.
27. Burke B, Giannoudis A, Corke KP, Gill D, Wells M, Ziegler-Heitbrock L, et al. Hypoxia-induced gene expression in human macrophages: implications for ischemic tissues and hypoxia-regulated gene therapy. *Am J Pathol* 2003;**163**:1233-43.
28. M. Muthana, A. Giannoudis, S.D. Scott, H.Y. Fang, S.B. Coffelt, F.J. Morrow et al. Use of macrophages to target therapeutic adenovirus to human prostate tumors. *Cancer Res*. 2011;**71**(5):1805-15. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-10-2349>. Ex 25
29. Muthana M, Rodrigues S, Chen YY, Welford A, Hughes R, Tazzyman S, et al. Macrophage delivery of an oncolytic virus abolishes tumor regrowth and metastasis after chemotherapy or irradiation. *Cancer Res* 2013;**73**(2):490-5, <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-12-3056>.
30. Cheng WS, Dzojic H, Nilsson B, Tötterman TH, Essand M. An oncolytic conditionally replicating adenovirus for hormone-dependent and hormone-independent prostate cancer. *Cancer Gene Ther* 2006;**13**(1):13-20.
31. Martinez-Quintanilla J, Seah I, Chua M, Shah K. Oncolytic viruses: overcoming translational challenges. *J Clin Invest* 2019;**4**(130):1407-18, <https://doi.org/10.1172/JCI122287>.
32. Hughes R, Qian BZ, Rowan C, Muthana M, Keklikoglou I, Olson OC, et al. Perivascular M2 macrophages stimulate tumor relapse after chemotherapy. *Cancer Res* 2015;**75**(17):3479-91, <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-14-3587>.
33. Hoshyar N, Gray S, Han H, Bao G. The effect of nanoparticle size on in vivo pharmacokinetics and cellular interaction. *Nanomedicine (Lond)* 2016;**11**(6):673-92, <https://doi.org/10.2217/nmm.16.5>.
34. Kelly C, Jefferies C, Cryan SA. Targeted liposomal drug delivery to monocytes and macrophages. *J Drug Deliv* 2011;**2011**:727241, <https://doi.org/10.1155/2011/727241>.
35. http://www.biophysics.bioc.cam.ac.uk/wpcontent/uploads/2011/02/DLS_Terms_defined_Malvern.pdf.
36. Gajewskj TF, Schell S, Nau G, Fitch FW. Regulation of T-cell activation. *Differences among T-cell subsets Immunol Rev* 1989;**111**:79-110, <https://doi.org/10.1111/j.1600-065x.1989.tb00543.x>.
37. Lapenna A, De Palma M, Lewis CE. Perivascular macrophages in health and disease. *Nat Rev Immunol* 2018;**18**(11):689-702, <https://doi.org/10.1038/s41577-018-0056-9>.
38. Lewis CE, Harney AS, Pollard JW. The multifaceted role of perivascular macrophages in tumors. *Cancer Cell* 2016;**30**(1):18-25, <https://doi.org/10.1016/j.ccell.2016.05.017>.
39. Gundem G, Van Loo P, Kremeyer B, Alexandrov LB, Tubio JM, Papaemmanuil E, Brewer DS, Kallio HM, Högnäs G, Annala M, et al. The evolutionary history of lethal metastatic prostate cancer. *Nature* 2015; **520**:353-357. [10.1038/nature14347](https://doi.org/10.1038/nature14347).
40. Grimaldi AM, Inoronato M, Salvatore M, Soricelli A. Nanoparticle-based strategies for cancer immunotherapy and immunodiagnosis. *Nanomedicine (Lond)* 2017;**12**(19):2349-65, <https://doi.org/10.2217/nmm-2017-0208>.
41. Wilczewska AZ, Niemirowicz K, Markiewicz KH, Car H. Nanoparticles as drug delivery systems. *Pharmacol Rep* 2012;**64**(5):1020-37.
42. Chen J, Gao P, Yuan S, et al. Oncolytic adenovirus complexes coated with lipids and calcium phosphate for cancer gene therapy. *ACS Nano* 2016;**10**(12):11548-60, <https://doi.org/10.1021/acsnano.6b06182>.
43. Aoyama K, Kuroda S, Morihiro T, et al. Liposome-encapsulated plasmid DNA of telomerase-specific oncolytic adenovirus with stealth effect on

- the immune system. *Sci Rep* 2017;**7**(1):14177, <https://doi.org/10.1038/s41598-017-14717-x>.
46. G. Bozzuto, A. Molinari. Liposomes as nanomedical devices. *Int J Nanomedicine* 2015;**10**:975–99. 10.2147/IJN.S68861.
47. Bulbake U, Doppalapudi S, Kommineni N, Khan W. Liposomal formulations in clinical use. *an updated review Pharmaceutics* 2017;**9**(2), <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics9020012>.
48. El Maghraby GM, Arafa MF. Liposomes for enhanced cellular uptake of anticancer agents. *Curr Drug Deliv* 2020;**17**(10):861-73.
49. Henriksen-Lacey M., Bramwell VW., Christensen D. et al. Liposomes based on dimethyldioctadecylammonium promote a depot effect and enhance immunogenicity of soluble antigen. *J Control Release* 2010 Mar 3;**142**(2):180–6. <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2009.10.022>. Epub 2009 Oct 26. PMID: 19874860
50. Marwa M, Amr SAL, Taro S, Eman A, Amal H, Hatem AS, et al. PEGylated liposomes: immunological responses. *Science and Technology of Advanced Materials* 2019;**20**(1):710 724, <https://doi.org/10.1080/14686996.2019.1627174>.
51. Lu Y, Cai Z, Xiao G, et al. CCR2 expression correlates with prostate cancer progression. *J Cell Biochem* 2007;**101**(3):676-85.
52. L. Zhang, F. Hedjran, C. Larson et al. A novel immunocompetent murine model for replicating oncolytic adenoviral therapy. *Cancer Gene Ther* 22, 17–22 (2015). <https://doi.org/10.1038/cgt.2014.64>.
53. S.J. Duncan, F.C. Gordon, D.W. Gregory, J.L. McPhie, R. Postlethwaite, R. White et al. Infection of mouse liver by human adenovirus type 5. *J Gen Virol* 1978; 40: 45–61. Return to ref 4 in article. CASArticle Google Scholar
54. Ginsberg HS, Moldawer LL, Sehgal PB, Redington M, Kilian PL, Chanock RM, et al. A mouse model for investigating the molecular pathogenesis of adenovirus pneumonia. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1991; **88**:1651-5.
55. S.I. Grivennikov, F.R. Greten, M. Karin. Immunity: “inflammation, and cancer”. *Cell* 2010; 140, 883–899. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2010.01.025>.
56. Mantovani A, Allavena P, Sica A, Balkwill F. Cancer-related inflammation. *Nature* 2008;**454**:436-44, <https://doi.org/10.1038/nature07205>.
57. de Visser KE, Eichten A, Coussens LM. Paradoxical roles of the immune system during cancer development. *Nat Rev Cancer* 2006;**6**: 24-37.
58. Dunn GP, Old LJ, Schreiber RD. The three Es of Cancer immunoediting. *Annu Rev Immunol* 2004;**22**:329-60.