



Università degli Studi di Ferrara

**Dottorato di Ricerca in
Biochimica, Biologia Molecolare e Biotecnologie
XXI ciclo**

Coordinatore Prof. FRANCESCO BERNARDI

STRATEGIE DI COSTRUZIONE DI VETTORI ERPETICI ONCOLITICI PER LA CURA DEL TUMORE EPATICO

Settore Scientifico Disciplinare MED/07

Dottoranda
Dr.ssa Francesca Rinaldi

Tutore
Prof. Roberto Manservigi

Anni 2006/2008

INDICE

INDICE

Introduzione

Virus dell'Herpes simplex	pag. 5
Virus oncolitici e strategie di <i>targeting</i>	pag. 12
Vettori erpetici oncolitici e carcinoma epatocellulare	pag. 17

Scopo della tesi

pag. 25

Materiali e Metodi

pag. 29

Risultati

Costruzione di virus oncolitici modificati nel <i>targeting</i> trascrizionale	pag. 37
A) Costruzione dei plasmidi codificanti la glicoproteina D sotto il controllo di promotori tumore specifico o tessuto specifico	pag. 38
B) Costruzione dei virus ricombinanti H6-HREgD e H6-EalbPgD	pag 39
Costruzione di VHS ricombinanti contenenti geni <i>reporter</i> all'interno di regioni intergeniche	pag. 41
A) Regione intergenica IGR20	pag. 41
B) Costruzione e purificazione dei virus H6-HREgD-IGR20:EGFP e H6-EalbPgD-IGR20:EGFP	pag. 42
C) Costruzione e purificazione dei virus H6-HREgD-IGR20:Hluc e H6-EalbPgD-IGR20:Hluc	pag. 44
Capacità di crescita in diverse linee cellulari dei virus H6-HREGD-IGR20:HLuc e H6-EALBPGD-IGR20:HLuc	pag. 46
Esperimenti " <i>in vivo</i> "	pag 48
Costruzione di VHS oncolitici modificati nel <i>targeting</i> recettoriale	pag. 52
A) Costruzione del plasmide codificante la proteina di fusione gD-PreSap	pag 53
B) Costruzione del virus ricombinante KgBpK ⁻ gC:PreS1apgD:PreS1ap	pag 55

Discussione

pag 59

Bibliografia

pag. 67

INTRODUZIONE

Gli herpesvirus costituiscono una numerosa famiglia di virus a DNA (Herpesviridae) in grado di infettare sia l'uomo che diverse specie animali. Attualmente sono stati caratterizzati più di 100 virus appartenenti a tale famiglia otto dei quali sono in grado di infettare naturalmente l'uomo: i virus dell'herpes simplex di tipo 1 e 2 (VHS-1 e VHS-2), il virus dell'herpes umano di tipo 3 (virus varicella zoster) e il virus dell'herpes umano di tipo 4 (virus di Epstein-Barr) facenti parte del sottogruppo *Alphaherpesvirinae*, i virus dell'herpes umano di tipo 5 (Citomegalovirus) 6 e 7 (HHV-6 e HHV-7) appartenenti al sottogruppo *Betaherpesvirinae*; il virus dell'herpes umano di tipo 8 (HHV-8 o virus di Kaposi) facente parte del sottogruppo *Gammaherpesvirinae*¹.

Tutti gli Herpesvirus conosciuti hanno caratteristiche biologiche comuni quali: (a) la presenza di un ampio numero di enzimi coinvolti nel metabolismo degli acidi nucleici, nella sintesi del DNA e nella sintesi e modificazione post-traduzionale delle proteine; (b) la sintesi del DNA virale e l'assemblaggio del capsido avvengono nel nucleo; (c) l'infezione virale produce la lisi della cellula infettata; (d) presentano una fase di latenza durante la quale, il genoma virale assume la forma di molecole circolari (stato episomale) e solamente una parte dei geni virali viene espressa².

VIRUS DELL'HERPES SIMPLEX

Epidemiologia

I VHS sono importanti agenti patogeni responsabili di una grande varietà di patologie molto diffuse nella popolazione umana. Rispetto agli altri tipi di herpesvirus i VHS hanno un ciclo replicativo piuttosto breve, determinano un marcato effetto citopatico, infettano cellule epiteliali e hanno uno spiccato neurotropismo³. Le infezioni erpetiche sono in genere caratterizzate da una sintomatologia dolorosa ma a prognosi benigna¹. Si distinguono due sierotipi, VHS-1 e VHS-2, che hanno in comune numerose caratteristiche come l'omologia del DNA, determinanti antigenici, tropismo tissutale e sintomi della malattia³. VHS-1 è più frequentemente associato a infezioni del tratto orofaringeo mentre VHS-2 interessa soprattutto il distretto caudale con infezioni ricorrenti nella zona genitale e perianale. Entrambi i sierotipi possono comunque infettare entrambi i distretti e possiedono la capacità di instaurare infezioni latenti e ricorrenti anche asintomatiche. Per tale motivo la persona infetta rappresenta una sorgente di contagio per tutta la vita.

Il virus viene trasmesso con il liquido delle vescicole, la saliva e le secrezioni vaginali. VHS-1 in genere è trasmesso per contatto orale, mentre VHS-2 è trasmesso principalmente per

contatto sessuale oppure dalla madre infetta al figlio durante il parto (infezione verticale). Più del 90% degli individui che vivono in aree sottosviluppate possiedono anticorpi specifici già all'età di due anni. Questo può risultare da condizioni di sovraffollamento e di scarse condizioni igieniche.

VHS-1: struttura e genoma

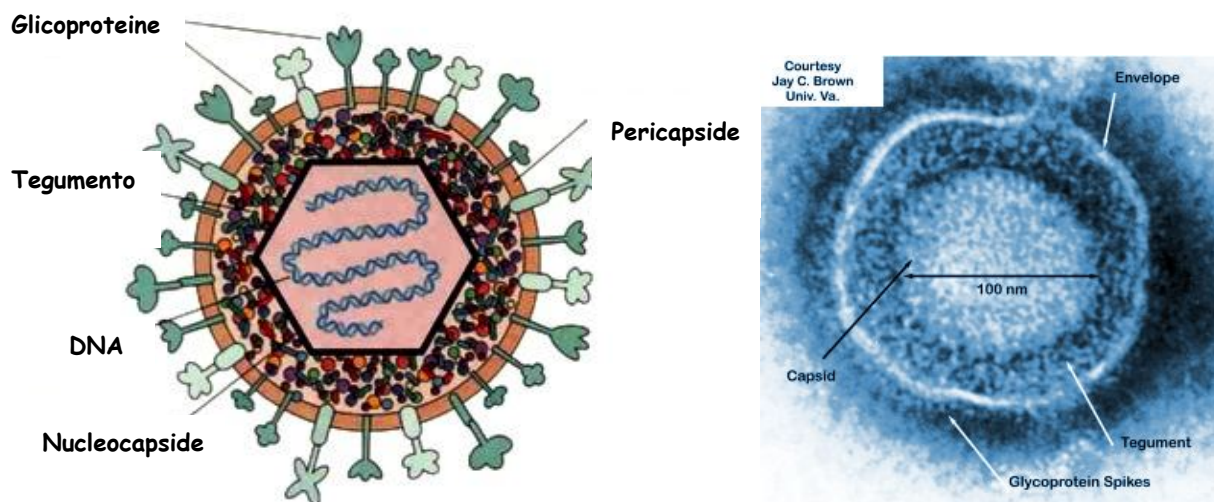


Figura 1. Struttura del virione di VHS-1. Dall'interno verso l'esterno sono riconoscibili: il *core* contenente il genoma virale, il capside, il tegumento e il pericapside; sulla superficie di quest'ultimo sono presenti numerose glicoproteine.

Le particelle virali di VHS-1 presentano un diametro di circa 150-200 nm e sono costituite da quattro elementi morfologici fondamentali⁴ (figura 1); dall'esterno verso l'interno si trovano:

- Un **pericapside** (o *envelope*) composto da un doppio strato lipidico, derivante da quello cellulare, che presenta sulla superficie varie glicoproteine virali, responsabili di diverse funzioni tra cui l'attacco alla membrana plasmatica, il legame con specifici recettori cellulari e la penetrazione del virus nel citoplasma⁵. Le glicoproteine sono inoltre le principali responsabili della patogenicità virale.
- Il **tegumento**, una matrice proteica che circonda il capside; le proteine presenti in questa sede sono responsabili dell'induzione dei geni virali⁶, dello *shut-off* delle proteine dell'ospite⁷ e dell'assemblaggio del virione.

- Il **capside**, struttura a simmetria icosaedrica formato da 162 capsomeri (150 esoni e 12 pentoni); è circondato dal tegumento e racchiude il “core”.
- Il **core**, struttura proteica centrale sulla quale è parzialmente avvolto il genoma virale costituito da DNA a doppia elica (dsDNA).

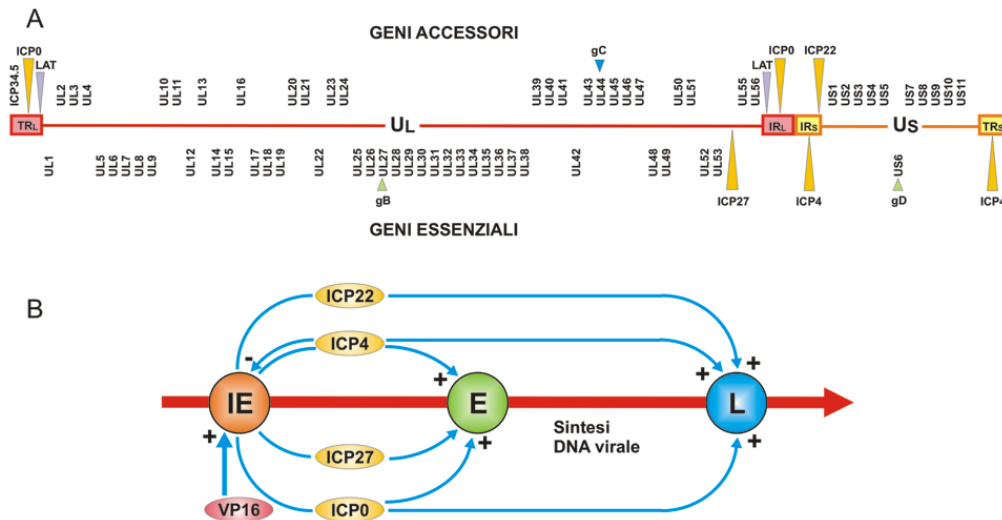


Figura 2. Organizzazione e regolazione del genoma di VHS-1. (A) Genoma del virus. Sono indicati i geni essenziali che sono richiesti per la replicazione virale *in vitro* e i geni non essenziali (accessori) che possono essere deleti senza interferire con la replicazione *in vitro*. **(B)** Successione temporale dell’espressione dei geni di VHS-1. La proteina VP16 del tegumento del virus interagisce col fattore Oct-1 cellulare nel regolare positivamente l’espressione dei geni IE. I prodotti dei geni IE -ICP4, ICP27 e ICP0- sono responsabili dell’attivazione dei geni E che a loro volta favoriscono la replicazione del DNA virale. I prodotti dei geni IE -ICP4, ICP22 e ICP27- regolano l’espressione dei geni L.

Il genoma di VHS-1 è costituito da DNA bicatenario e lineare, che circolarizza al momento della sua entrata nel nucleo. Ha una lunghezza di circa 152 kb e un peso molecolare di 96×10^6 DA (Dalton), composto per il 68% da citosina e guanina. Il genoma riportato in figura 2, è costituito da due sequenze uniche, una lunga e una corta chiamate rispettivamente U_L e U_S (*Unique Long* e *Unique Short*) separate da sequenze ripetute interne denominate IR_L e IR_S (*Internal Repeats*). Queste ultime sono invertite rispetto alle sequenze ripetute poste all’estremità del genoma, denominate TR_L e TR_S (*Terminal Repeats*), che interagiscono tra loro al momento della circolarizzazione del genoma⁵.

Il genoma comprende almeno 84 geni: tra questi, ICP0, ICP4, ICP34.5 e LAT sono situati nelle sequenze ripetute e sono presenti in duplice copia suddivisi. Tra gli 84 geni si possono distinguere 38 geni essenziali per la replicazione virale e 46 geni non essenziali, o accessori, per la replicazione *in vitro*, la cui eventuale mancanza non interferisce con il processo replicativo.

Tra i geni essenziali sono compresi in particolare quelli codificanti per le glicoproteine pericapsidiche B, D e l'eterodimero gH-gL responsabili dell'entrata e della penetrazione di VHS-1 all'interno della cellula, al contrario della glicoproteina pericapsidica C che è invece codificata da un gene accessorio. Il virus inoltre codificando per molti enzimi necessari per la sua replicazione fra cui DNA polimerasi, timidina chinasi (TK), ribonucleotide reduttasi (RR) e uracil-DNA glicosilasi (UDG), è in grado di infettare in modo produttivo anche cellule non in attiva replicazione, come i neuroni dove è in grado di instaurare la latenza.

L'espressione genica di VHS-1 è regolata in modo ordinato e sequenziale secondo un meccanismo di regolazione a cascata (fig 2). In base alla cinetica di espressione, i geni di VHS-1 possono essere suddivisi in tre classi:

1. **Geni α** o precocissimi (*Immediate Early-IE*), codificanti per le proteine ICP0, ICP4, ICP22, ICP27 e ICP47. Tranne ICP47 i prodotti dei geni α sono proteine transattivanti che permettono l'espressione dei geni β .
2. **Geni β** o precoci (*Early-E*), estremamente eterogenei perché codificanti in parte per proteine necessarie per la replicazione del genoma virale e in genere coinvolte nel metabolismo degli acidi nucleici, in parte per proteine transattivanti, per permettere l'espressione dei geni γ e infine anche per le prime proteine strutturali.
3. **Geni γ** o tardivi (*Late-L*), codificanti per proteine prevalentemente strutturali, necessarie per la formazione di capsidi e pericapsidi. Possono essere suddivisi a loro volta in γ_1 e γ_2 :
 - γ_1 , la cui espressione è indipendente dalla replicazione virale. Ne fanno parte per esempio i geni codificanti per le glicoproteine B e D e il gene codificante per la proteina ICP34.5.
 - γ_2 , i cui prodotti proteici vengono sintetizzati solo dopo la replicazione virale (es. gC).

Ciclo replicativo

L'infezione e la replicazione di VHS-1 sono determinate da una successione di eventi che avvengono all'interno della cellula e che portano alla formazione di nuove particelle virali.

FASE DI ASSORBIMENTO: questa fase è mediata dalle glicoproteine presenti sul pericapside virale attraverso il legame con specifici recettori cellulari. In particolare è stato dimostrato che le glicoproteine B e C (gB e gC) sono coinvolte nella fase iniziale di assorbimento attraverso l'interazione con alcuni glucosamminoglicani (GAG) localizzati sulla superficie cellulare e costituiti principalmente dall'eparan-solfato (HS), ma anche dal dermatan-

solfato e dal condroitin-solfato^{8,9}. Questo iniziale legame posiziona la particella virale in modo tale da facilitare un secondo legame a più alta affinità tra la gD e specifici recettori cellulari (figura 3). Questi appartengono a tre classi molecolari strutturalmente molto diverse tra loro. Il primo di tali recettori ad essere identificato, denominato HVEM o HveA (*herpes virus entry mediator*), è un membro della famiglia di recettori per il *Tumor necrosis factor* (TNF/ α NGF) ristretto solo ad alcuni tipi di cellule⁹. Il secondo tipo di recettori, chiamato HveC o nectina-1, è un membro delle nectine che sono molecole di adesione intercellulare membri della superfamiglia delle immunoglobuline ampiamente espressi da numerosi tipi cellulari^{10,11}. L'ultimo tipo di recettori è invece costituito dal 3-O-S HS, molecola derivata dall'attività enzimatica di alcune D-glucosaminil O-solfotransferasi presenti sull'HS^{10,12}.

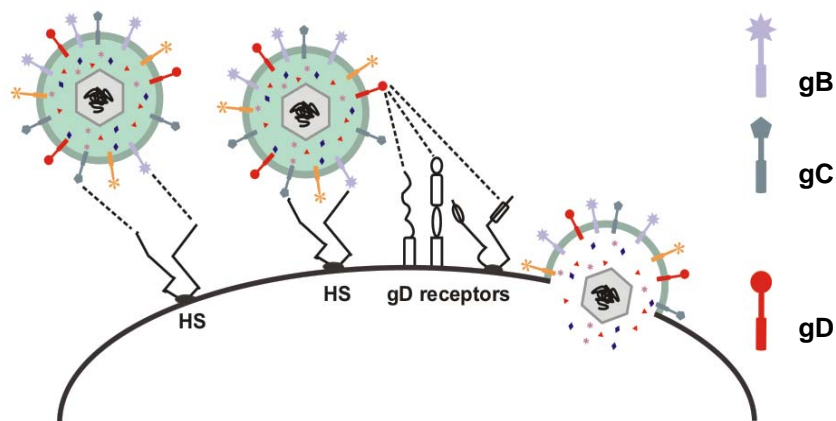


Figura 3: Rappresentazione schematica di assorbimento e penetrazione di VHS-1 nella cellula.

FASE DI PENETRAZIONE: in seguito al legame con i recettori cellulari il pericapside si fonde con la membrana cellulare e di conseguenza il nucleocapside viene liberato all'interno del citoplasma. La gD è la principale responsabile del processo di fusione tra il pericapside virale e la membrana cellulare. Recenti studi biochimici e strutturali hanno, infatti, dimostrato che le due funzioni di gD, di legame con Hve e di attivazione del meccanismo di fusione, risiedono in domini differenti e una volta che la gD si lega al proprio recettore, si verificano delle modificazioni nella sua struttura che la portano ad interagire con il complesso fusogeno costituito da gB e dall'etrodimero gH-gL innescando così la fusione del pericapside con la membrana cellulare^{10,13}.

REPLICAZIONE E TRASCRIZIONE: dopo la penetrazione il nucleocapside viene trasportato in corrispondenza dei pori nucleari e il genoma viene liberato all'interno del nucleo, dove avvengono la trascrizione e la replicazione del DNA virale. La replicazione avviene secondo il modello di cerchio rotante, portando alla formazione di strutture concatamERICHE che sono poi suddivise in monomeri ed impacchettate all'interno dei capsidi. Il DNA virale è trascritto dall'RNA polimerasi II dell'ospite, ma con la partecipazione di fattori virali a tutti gli stadi dell'infezione.

ASSEMBLAGGIO E USCITA: alla sintesi delle macromolecole poi segue l'assemblaggio dei virioni nel nucleo della cellula ospite con l'inserimento del DNA nei capsidi vuoti preformati. I nucleocapsidi acquisiscono l'involucro pericapsidico gemmando attraverso le membrane nucleari modificate dall'inserzione di specifiche glicoproteine virali. A questo punto le particelle virali mature escono per esocitosi dal nucleo, attraversano il reticolo endoplasmatico e l'apparato del Golgi lasciando la cellula infettata per esocitosi. Il processo di replicazione si completa in circa 18 ore con la lisi della cellula infettata^{4,5}.

Latenza e riattivazione

L'infezione primaria di VHS, a differenza di altri herpesvirus che raggiungono la sede di latenza tramite viremia, rimane localizzata alla zona di contatto del virus con la cute, dove determina infezioni litiche in fibroblasti e cellule epiteliali. In seguito però il virus penetra nelle terminazioni nervose sensitive che innervano il sito d'infezione primaria e, risalendo in senso retrogrado lungo gli assoni, grazie all'interazione di proteine del tegumento associate al nucleocapside con proteine del citoscheletro, arriva al corpo cellulare del neurone stesso dove instaura la latenza. Generalmente VHS-1 si localizza a livello del ganglio trigemino e cervicale mentre VHS-2 nei gangli sacrali. Durante lo stato di latenza, il genoma virale rimane associato agli istoni in uno stato epicromosomiale senza interagire con il genoma dell'ospite. Durante l'infezione latente il virus rimane in uno stato relativamente quiescente, non vi sono manifestazioni cliniche e non è nemmeno possibile evidenziare il virus o antigeni virali a livello dei gangli nervosi, fatta eccezione per la presenza di trascritti virali associati alla latenza LATs, la cui funzione è ancora sconosciuta.

In presenza di determinati stimoli sia ambientali come l'esposizione prolungata a raggi UV, sia soggettivi, come stress, malattie febbrili, temporanea immunosoppressione, interventi chirurgici a carico della sede neurologica della latenza, si può avere la riattivazione di VHS dallo stato di latenza. In seguito ad essa il virus intraprende un percorso anterogrado tramite il

quale raggiunge la sede di infezione primaria dando luogo a nuovi cicli litici denominati recidive erpetiche (figura 4). Spesso le recidive erpetiche sono asintomatiche o paucisintomatiche assumendo un decorso estremamente sfavorevole in pazienti immunocompromessi^{1,4}.

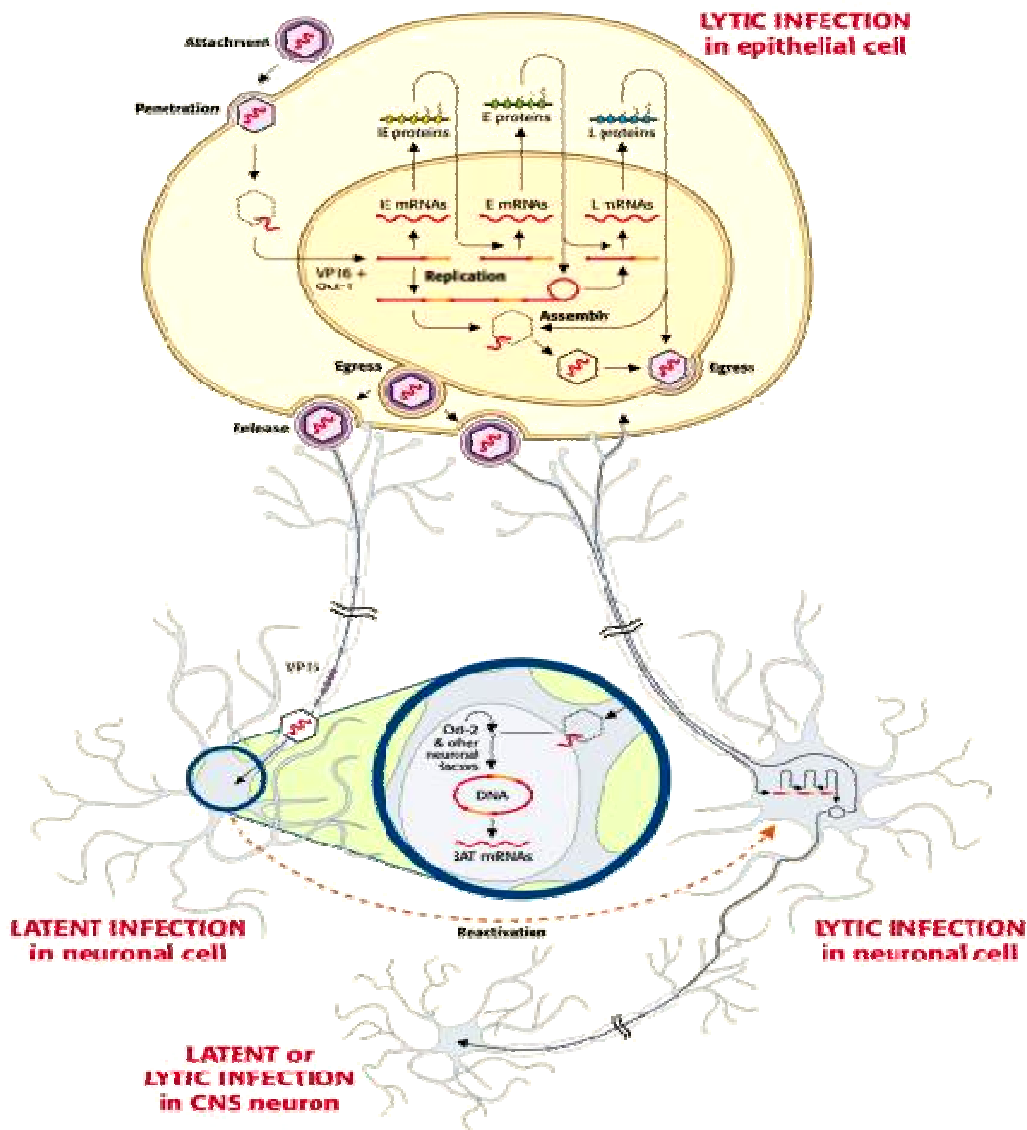


Figura 4. Ciclo replicativo di VHS-1

VIRUS ONCOLITICI E STRATEGIE DI *TARGETING*

I progressi nella scienza e nella tecnologia ottenuti sin dall'inizio del 20° secolo hanno aperto la strada alle attuali terapie standard contro il cancro come la radioterapia e la chemioterapia, che vengono largamente impiegate, pur mostrando a volte una scarsa efficacia e notevoli effetti collaterali e hanno spesso la conseguenza di peggiorare ulteriormente la qualità di vita del paziente anziché migliorarla¹⁴. All'inizio del 21° secolo grazie ai progressi fatti nella biologia dei tumori e nella genetica cellulare e virale, si sono aperte nuove opportunità per la ricerca di terapie antineoplastiche più efficaci e meno tossiche. In particolare alla fine degli anni '50 iniziò ad emergere un nuovo approccio interessante per la terapia del cancro: la *viroterapia oncolitica*.

Il concetto di utilizzare virus replicativi come agenti antitumorali risale all'osservazione, fatta all'inizio del secolo scorso, di regressione spontanea di tumori in pazienti vaccinati contro la rabbia o che erano stati soggetti ad infezioni virali.

Un vettore replicativo ideale per la terapia genica dei tumori dovrebbe derivare da virus che sono naturalmente endemici nella popolazione umana e con una patogenicità lieve per l'uomo in modo tale che una eventuale reversione del virus al fenotipo *wild type* (*wt*) non sarebbe troppo rischiosa per il paziente o per la popolazione¹⁵. Esistono in particolare determinate caratteristiche che un vettore virale oncolitico dovrebbe possedere¹⁶. Tale virus dovrebbe essere: (i) facile da ingegnerizzare ed essere prodotto ad alti titoli; (ii) selettivo per le sole cellule neoplastiche; (iii) poco tossico per le cellule normali; (iv) in grado di replicarsi rapidamente all'interno della massa tumorale in continua crescita, distruggendola; (v) in grado di disseminarsi anche in siti distanti dall'iniziale sito di inoculazione; (vi) incorporare un meccanismo di inattivazione che funga da "sistema di sicurezza"; (vii) in grado di indurre una risposta immunitaria antitumorale sia aspecifica che specifica^{17,18-27}.

I virus oncolitici mediano la distruzione delle cellule tumorali potenzialmente attraverso diversi meccanismi. Innanzi tutto, mediante lisi diretta come risultato della replicazione virale. Alcuni virus oncolitici (ad esempio adenovirus), ancora, producono durante il loro ciclo replicativo delle proteine che sono citotossiche per le cellule tumorali. Tali virus possono inoltre indurre una risposta immunitaria antitumorale sia aspecifica che specifica. Si è infine osservato che i virus oncolitici sono in grado di indurre un'augmentata sensibilità delle cellule tumorali alla chemio e alla radioterapia e che si può stimolare un'attività antineoplastica mediante l'inserimento di geni terapeutici nel genoma di tali vettori.

Lo studio dei vettori virali oncolitici si basa, quindi, sulla capacità, innata o creata attraverso modificazioni genetiche, di infettare in maniera selettiva la massa tumorale. Alcuni tipi di virus

presentano, infatti, un naturale tropismo per le cellule tumorali e vengono utilizzati nella loro forma *wt* senza modifiche al genoma come ad esempio Reovirus, New Castle Disease virus (NDV), virus delle stomatiti vescicolari (VSV), parvovirus, Coxsackievirus ecc... Questi virus sono oggetto di intense ricerche nel campo della viroterapia anche se la loro efficacia oncolitica si è limitata finora ad alcuni studi e *trials* preclinici e clinici¹⁵.

La maggior parte dei virus oncolitici, invece, viene geneticamente modificata per aumentare la specificità verso i tumori limitando il rischio di infezione per i tessuti sani, attraverso modifiche del tropismo cellulare o a livello della replicazione virale. Questa strategia, denominata *targeting*, può essere ottenuta andando a modificare i meccanismi che regolano la replicazione (*targeting* di replicazione), l'espressione genica (*targeting* di espressione) o l'entrata e la penetrazione del virus nella cellula (*targeting* recettoriale).

Il ***targeting* di replicazione** può essere ottenuto mediante delezioni o mutazioni di geni non essenziali alla replicazione del virus in colture cellulari, che rendono la replicazione virale dipendente dal tipo cellulare che il virus infetta. Le delezioni del genoma interessano soprattutto fattori di virulenza e sequenze codificanti uno o più enzimi coinvolti nei meccanismi di attivazione della replicazione e riparo del DNA. In tal modo la replicazione virale è limitata ai soli tessuti in attiva divisione come quelli tumorali. Negli ultimi anni sono stati sviluppati innumerevoli vettori replicativi attenuati impiegati come agenti antitumorali basati sul virus dell'Herpes simplex (VHS-1), Adenovirus (Ad), Vaccinia virus e Reovirus molti dei quali sono già testati in vari *trials* clinici con risultati molto favorevoli. Tuttavia un limite a questa strategia è rappresentato dal fatto che molti tipi cellulari presentano un alto indice mitotico e può risultare difficile per tali virus discriminare tra cellula normale in proliferazione e cellula tumorale.

Il ***targeting* di espressione o trascrizionale** si basa sull'uso di promotori tessuto-specifici, cellula-specifici o tumore-specifici che premettono l'espressione di un transgene o di un gene essenziale per la replicazione del virus solo nelle cellule bersaglio. Riprogrammare le funzioni replicative utilizzando questo tipo di approccio risulta essere più semplice in virus a DNA quali Ad, VHS-1 o Poxvirus, in quanto presentano genomi estesi in cui risulta facile l'inserimento di elementi esogeni²⁸. In particolare l'uso di promotori tessuto specifici come AFP (Alpha-fetoprotein), MUC1, PSA (Prostate-specific antigen) e TERT (Telomere reverse transcriptase) è stato ampiamente esplorato nei vettori oncolitici adenovirali per quanto riguarda il controllo dell'espressione dei geni precocissimi E1A e E1B²⁹⁻³². Nel caso di VHS-1 gli esperimenti si sono concentrati sul gene precocissimo che codifica per la proteina essenziale ICP4 posto sotto il controllo trascrizionale del promotore tessuto specifico dell'albumina, proteina altamente espressa nel fegato. Tuttavia una limitazione all'uso di tali promotori risiede proprio nel fatto che

la replicazione virale è reindirizzata a specifici tipi tumorali e si restringe spesso solo a dei sottogruppi cellulari in cui il promotore è attivo. A questo proposito negli ultimi anni sono stati testati diversi promotori attivi in vari tipi di tumori o promotori sensibili alle radiazioni anche se vi sono diverse prove che dimostrano una loro parziale attività anche in cellule normali aumentando di conseguenza il rischio di tossicità dei vettori. Un ulteriore ostacolo è rappresentato dalla probabilità che all'interno del tumore il promotore non si attivi in tutte le cellule tumorali e che quindi non tutte le cellule in seguito alla somministrazione del vettore verranno infettate³³⁻³⁷.

Il **targeting recettoriale** si propone di alterare lo spettro d'ospite del virus, modificando le molecole virali coinvolte nel riconoscimento della superficie cellulare, senza però compromettere l'abilità del virus di penetrare nella cellula. Sono possibili due diversi tipi di strategie per effettuare un *targeting* recettoriale: (i) utilizzare una molecola bi-adattatrice, che non prevede la modificazione genetica del virus; (ii) effettuare delezioni nei geni che codificano le molecole coinvolte nel legame del virus alla cellula ospite, sostituendole con molecole che possiedono una specificità diversa.

L'utilizzo di una molecola bi-adattatrice è stato molto studiato soprattutto per la modificazione del tropismo adenovirale e retro virale e negli ultimi anni è stato preso in considerazione anche per i vettori erpetici. Tale molecola potrebbe essere rappresentata da: (1) un anticorpo bi-specifico, in grado di riconoscere da una parte una delle molecole di superficie del virus coinvolta nel legame alla cellula, dall'altra un recettore su una specifica cellula bersaglio; (2) una proteina di fusione tra la porzione variabile di un anticorpo a singola elica (scFv) diretto contro una delle molecole di superficie del virus e un ligando in grado legarsi ad una specifica cellula bersaglio; (3) una proteina di fusione tra la forma solubile di uno dei recettori cellulari del virus, quindi in grado di legarsi a questo, ed un scFv o un ligando in grado di legarsi ad una specifica cellula bersaglio. Studi *in vitro* hanno dimostrato la funzionalità di tali molecole bi-adattatrici, ma mancano tuttora studi che ne verifichino l'applicabilità e la stabilità *in vivo*.

La sostituzione genetica delle molecole responsabili del tropismo naturale con nuovi ligandi in grado di re-dirigere l'infezione verso cellule o tessuti bersaglio, senza tuttavia influenzare la fase di penetrazione, presuppone che siano noti i meccanismi di legame e di penetrazione del virus nella cellula ospite. Molte molecole coinvolte nel legame del virus alla cellula sono inoltre responsabili delle successive fasi di penetrazione ed in alcuni casi risulta impossibile modificare l'affinità di legame senza alterare le proprietà fusogeniche delle proteine coinvolte. Inoltre, la modificazione delle molecole di superficie determina in alcuni casi una riduzione dell'infettività

virale, con conseguente diminuzione della capacità di trasferimento genico. Tale tipo di *targeting* recettoriale prevede l'impiego di strategie diverse, che dipendono dal tipo di virus sul quale è costruito il vettore. Per quanto riguarda i vettori basati su VHS-1 nonostante il meccanismo elaborato che sta alla base dell'entrata e della penetrazione del virus all'interno delle cellule, sono state descritte negli anni innumerevoli mutazioni a carico delle glicoproteine pericapsidiche gB, gC e gD. Per quanto riguarda i vettori adenovirali, invece, occorre modificare i domini di legame delle proteine capsidiche coinvolte nel legame al CAR (*coxsackie e adenovirus receptor*) e alle integrine, presenti rispettivamente sulla fibra esonica e sulla base pentonica, sostituendoli con specifici ligandi esterni³⁸⁻⁴⁰. È stato dimostrato che vettori privi dei domini di legame al CAR e alle integrine perdono la maggior parte del tropismo naturale di Ad, ma resta ancora incerto se vi siano altre interazioni della fibra con molecole del complesso maggiore di istocompatibilità di classe I (MHC-I) e con l'HS⁴¹⁻⁴⁴.

Le modificazioni necessarie per mantenere un *targeting* genetico nei vettori retrovirali sono in parte complicate dal fatto che, oltre a dover trovare dei siti adatti per l'inserzione di nuovi ligandi sul pericapside virale, non si conosce ancora con precisione la natura dei recettori primari e secondari coinvolti nel legame del virus alla cellula. È stato dimostrato che la proteina *env*, maggiormente modificata per le strategie di *targeting* retrovirale, non è in realtà richiesta per il legame iniziale del virus alla cellula⁴⁵⁻⁴⁷. Nonostante ciò, diversi gruppi hanno riportato dati positivi relativi al re-*targeting* di vettori retrovirali attraverso l'inserzione di ligandi all'interno di glicoproteine pericapsidiche.

Tra i virus oncolitici uno dei più studiati è l'**Adenovirus**, un virus a doppia elica di DNA, endemico per la popolazione umana e la cui patogenicità è associata ad infezioni del tratto respiratorio. I vettori adenovirali possono essere resi selettivi per i tumori mediante mutazioni o delezioni che coinvolgono i geni precoci E1 (E1A o E1B). I prodotti di tali geni, infatti, bloccano i fattori cellulari pRb e p53 responsabili rispettivamente dell'attivazione del ciclo cellulare e del blocco dell'apoptosi, processi comunemente alterati nelle cellule cancerose. I vettori adenovirali deleti in tali geni si replicheranno quindi preferenzialmente nei tumori piuttosto che nei tessuti sani^{48,49}. Un esempio di adenovirus E1-negativo è il vettore Onyx-015 (dl1520) che presenta due mutazioni nel gene E1B. La sicurezza e l'efficacia del virus sono state testate in numerosi *trials* clinici di fase I, II e III con vari tipi di tumori, in diverse vie di somministrazione e in associazione o meno con le normali terapie antitumorali. I risultati più incoraggianti sono stati ottenuti iniettando il vettore direttamente all'interno del tumore e in associazione al trattamento con il 5-fluorouracile (5-FU) e il cisplatino⁵⁰. Altri vettori adenovirali, attualmente in fase di studio sull'uomo, presentano delezioni in geni differenti come ad esempio il gene E3 o E4 e

l'inserimento di promotori tumore- o tessuto-specifici a monte dei geni E1A e/o E1B allo scopo di limitare ulteriormente la replicazione ai soli tessuti tumorali.

Un virus che solo di recente è entrato a far parte del panorama dei vettori oncolitici è il **Vaccinia virus**; molti mutanti derivati da questo virus, sono stati costruiti per essere in grado di trasportare, in maniera efficiente, geni terapeutici nel tumore, mostrando una buona capacità di “*gene delivery*”, oltre ad una naturale capacità oncolitica. I geni virali SPI-1 e SPI-2, necessari per la replicazione nelle cellule normali, vengono deleti per aumentare la selettività del virus per le cellule tumorali e per permettere l'inserimento all'interno del vettore, di geni esogeni come citochine o enzimi in grado di attivare profarmaci.

Un altro virus di rilevante importanza nel campo della viroterapia dei tumori e attualmente in fase di studio in diversi *trials* clinici per tumori del sistema nervoso centrale, è il virus dell'Herpes simplex di tipo 1.

Nella figura 5 di seguito riportata sono indicate le principali famiglie di virus umani a DNA e RNA attualmente utilizzati o in procinto di esserlo nei vari *trials* clinici.

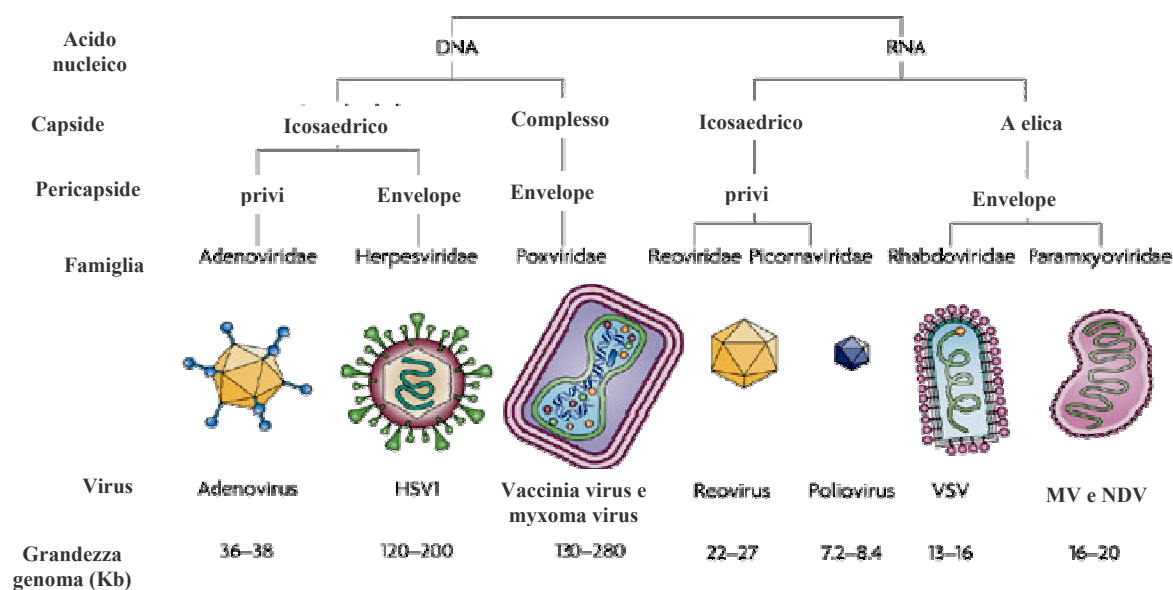


Figura 5. Principali virus oncolitici attualmente utilizzati nei *trials clinici* per la cura dei tumori. In figura sono riassunte le principali caratteristiche di sette famiglie di virus oncolitici. Le forme ricombinanti di tutti i virus a DNA mostrati sono attualmente impiegati in *trials* clinici, mentre per quanto riguarda i virus a RNA i *trials* hanno interessato per ora solo i ricombinanti basati sul virus MV; vettori basati su poliovirus e su VSV sono attualmente sottoposti a *trials* pre-clinici mentre forme non ingegnerizzate di reovirus e NDV sono già entrati nei *trials* di fase I e II. HSV-1, herpes simplex virus; MV, measles virus; NDV, Newcastle disease virus; VSV, vesicular stomatitis virus.

VETTORI ERPETICI ONCOLITICI E CARCINOMA EPATOCELLULARE

Sono numerose le caratteristiche che rendono il virus dell'Herpes simplex di tipo 1 un buon candidato come vettore per la terapia genica contro il cancro. Nonostante il naturale neurotropismo, VHS-1 è in grado di infettare differenti tipi di cellule, sia in attiva divisione che quiescenti; il genoma di 152 Kb può essere modificato in modo da contenere più transgeni in diversi punti, permettendo l'espressione simultanea di proteine terapeutiche veicolate da un unico vettore; al contrario di vettori derivati da retrovirus e virus adenoassociati, il genoma di VHS-1 non si integra in quello cellulare ed inoltre, i vettori derivanti da VHS-1 possono essere costruiti abbastanza rapidamente e prodotti su larga scala in grande quantità. Infine, VHS-1 possiede un meccanismo di inattivazione legato al gene della timidina chinasi (TK) che, in presenza di farmaci come Ganciclovir o Aciclovir, è in grado di bloccare la replicazione virale.

La prima generazione di vettori oncolitici conteneva la mutazione di un singolo gene ad esempio la TK, l'UL39 codificante l'ICP6, la ribonucleotide reduttasi (RR), come nel caso del mutante hrR3 o entrambe le copie del gene codificante per ICP34.5, nel caso dei mutanti R3616 e VHS1716, che avevano come scopo quello di restringere la loro replicazione a cellule in attiva divisione. Tali mutanti però sono risultati spesso essere troppo tossici e, soprattutto, poco sicuri in quanto un singolo evento ricombinativo poteva indurre la reversione al fenotipo *wild type*.

Per ovviare a questo rischio sono stati costruiti vettori oncolitici di seconda generazione contenenti delezioni multiple nei geni sopra descritti che, sebbene conferivano una maggiore sicurezza al vettore, ne determinavano spesso un'attenuazione troppo forte tanto da limitare la distruzione di tutta la massa tumorale. A questo gruppo appartiene il mutante G207 deleto in entrambi i loci γ 34.5 e contenente un'ulteriore mutazione nella regione UL39, che aumenta la specificità del vettore per le cellule in attiva divisione come quelle tumorali⁵¹. G207 è stato testato in più di 60 linee cellulari e si è dimostrato efficace in tutte le linee tumorali ad eccezione di quelle derivanti dal midollo spinale⁵². I buoni risultati ottenuti nei numerosi esperimenti sul modello animale hanno permesso a questo vettore di completare la fase I dei *trials* clinici⁵³ e di entrare nella fase II, attualmente in corso come agente antitumorale per i gliomi maligni. A tale riguardo è stato recentemente pubblicato un articolo in cui vengono descritti gli incoraggianti risultati ottenuti in seguito all'inoculazione di dosi ravvicinate nel tempo di G207 prima mediante catetere intracranico, poi mediante varie iniezioni stereotattiche attorno alla zona in cui è avvenuta la resezione chirurgica del tumore⁵⁴.

Il vettore NV1020 (o R7020), costruito successivamente sulla base dei promettenti risultati ottenuti con G207, è un ricombinante chimerico contenente una porzione dell'US

derivante da VHS-2 e delezioni che interessano l'UL24, l'UL56 e una copia del gene γ 34.5. Gli esperimenti *in vitro* e sul modello animale evidenziarono una replicazione selettiva nelle cellule tumorali, confermando i risultati sulla sicurezza, e un effetto oncolitico maggiore rispetto al precedente vettore G207, grazie alla presenza di una copia del gene γ 34.5 che aumentava la virulenza del vettore⁵⁴. Attualmente stanno terminando i *trials* clinici di fase I su pazienti con carcinoma del colon, associato a metastasi epatiche, in cui per la prima volta si è sperimentata la somministrazione per via intratumorale di un vettore oncolitico.

Anche se i risultati ottenuti con i vettori sopra descritti si potevano considerare soddisfacenti, è evidente che un virus oncolitico da solo non può essere in grado di distruggere la massa tumorale, ma che è necessaria una terapia combinata per aumentare la sicurezza e l'efficacia del sistema; per questo motivo, i vettori oncolitici erpetici furono modificati in modo da contenere cassette di espressione codificanti diversi transgeni che hanno dimostrato in innumerevoli studi clinici e preclinici di aumentare l'efficacia anti-tumorale dei vettori soprattutto se in associazione a terapie tradizionali. Un effetto sinergico antitumorale fu osservato per esempio nei virus oncolitici che esprimevano vari tipi di interleuchine e interferoni come ad esempio IL-4⁵⁵, IL-12⁵⁶⁻⁵⁹, IL-10⁵⁶, GM-CSF^{47,59,60} e B7.1⁶¹ in grado di aumentare la risposta immune verso il tumore e ridurre la tossicità derivata dalla somministrazione sistemica delle citochine. Attualmente sono in corso gli studi clinici di fase II del vettore OncoVex^{GM-CSF} nel cui genoma, delecto del gene ICP47 e di entrambe le copie del gene γ 34.5, è stata inserita la cassetta di espressione del gene GM-CSF, capace di aumentare la risposta immunitaria nei confronti del tumore⁶².

Altre importanti studi hanno avuto come oggetto i geni suicidi (o *killer*), geni che codificano per proteine, solitamente enzimi di origine virale o batterica, capaci di convertire un profarmaco non tossico in un composto tossico che causa la morte selettiva della cellula esprimente il gene stesso. L'aspetto importante della terapia "gene/profarmaco", è rappresentato dalla tossicità selettiva, in quanto la conversione in farmaco tossico avviene solo nelle cellule tumorali trasdotte. Inoltre, l'effetto *bystander*, reso più efficace dall'introduzione ulteriore di transgeni come geni fusogenici, permetterebbe il passaggio del metabolita tossico anche alle cellule non direttamente infettate aumentando la potenzialità antitumorale del vettore come si è riscontrato per i mutanti Synco2 e Synco-2D⁶³⁻⁶⁵ che, testati in vari tipi di tumori come quello epatico, ovarico e il carcinoma metastatico della prostata hanno mostrato un significativo incremento dell'oncolisi virale⁶⁶.

Risulta chiaro però che per limitare il più possibile il danno ai tessuti sani e per creare vettori sicuri che possano essere somministrati anche per via intravenosa è necessario far acquisire al

virus una specifica combinazione di *targeting* sia a livello dell'ingresso del virus nella cellula sia a livello dell'espressione genica e della replicazione.

Per quanto riguarda il *targeting* recettoriale, l'alterazione del tropismo cellulare di VHS-1 risulta un processo altamente complesso visto il meccanismo elaborato che sta alla base dell'entrata e della penetrazione di VHS-1 all'interno delle cellule. Finora sono state descritte innumerevoli mutazioni a carico delle glicoproteine pericapsidiche, ma risulta evidente che se per quanto riguarda la gC, che non è essenziale per la replicazione virale, si possono effettuare delezioni anche ampie nella sua sequenza codificante, per la gB, la gD e per l'eterodimero gH-gL, che sono invece essenziali per la replicazione, sono necessarie mutazioni e delezioni ben mirate al fine di non alterare troppo la loro struttura conformazionale e di conseguenza la loro attività.

Studi condotti nel nostro laboratorio in collaborazione con l'Università di Pittsburgh hanno portato alla costruzione di un ricombinante virale in cui è stata abolita l'interazione tra gB e gC con l'HS. Questo virus ricombinante delevato nel dominio extracellulare di gC e nei domini di legame di gB all'HS (9 aminoacidi che costituiscono la regione pK di gB) chiamato KgBpK⁻gC⁻ possiede una ridottissima capacità di legame alla superficie cellulare. Glorioso e collaboratori hanno ulteriormente modificato questo virus per dirigere l'infezione alle cellule presentanti il recettore per l'eritropoietina (EPO) utilizzando la molecola di fusione gC-EPO. Nonostante tale proteina fosse incorporata nel pericapside, il virus si è dimostrato non infettivo, probabilmente a causa della sua internalizzazione in vescicole endocitiche e all'assenza di recettori per gD. Nel nostro laboratorio è stato costruito il virus ricombinante KgBpK⁻gC:PreS1ap, in cui la parte della porzione extracitoplasmatica di gC è stata rimpiazzata dal peptide PreS1ap, derivante dalla regione PreS del virus dell'epatite B, creando così la molecola di fusione gC:PreS1ap, che permette al virus di riconoscere specificamente le cellule epatiche, mantenendo però una capacità residua di legame a cellule diverse in parte dovuta alla presenza di gD¹⁷. Roizman e collaboratori hanno costruito anche un mutante virale che presenta, oltre alle delezioni nei domini di legame all'HS, anche una delezione nel dominio di gD responsabile del legame al recettore HveA, sostituito con l'interleuchina 13⁶⁷. Quest'ultimo mutante è in grado di riconoscere specificamente cellule che esprimono il recettore IL13α2 ma è ancora in grado di riconoscere altri recettori specifici per gD^{68,69}. In altri studi sono stati utilizzati ligandi differenti come ad esempio il frammento N-terminale dell'attivatore del plasminogeno urochinasi, o il 6-His posizionati sempre nell'*envelope* virale come proteine di fusione^{70,71}. Recentemente il *targeting* è stato acquisito anche mediante l'utilizzo di una molecola bi-adattatrice composta da un recettore

per un fattore di crescita epidermico 2/neuregulina (HER2/neu) associato mediante la porzione variabile di un anticorpo a singola elica (scFv) al dominio di legame della gD con la nectina-1 che ha reindirizzato il tropismo di VHS-1 ai recettori del tumore mammario^{72,73,12}.

Il *targeting* di espressione o di trascrizione si basa, invece, sull'uso di promotori tessuto-specifici o tumore-specifici che permettono l'espressione di geni essenziali per la replicazione del virus solo nelle cellule bersaglio⁷⁴. A tale proposito sono stati studiati molti promotori tessuto e tumore specifici. Nel caso di VHS-1 i primi esperimenti sono stati condotti soprattutto sul gene precocissimo che codifica per la proteina essenziale ICP4 come nel caso del mutante G92A in cui il promotore endogeno di ICP4 è stato sostituito con il promotore dell'albumina, proteina altamente espressa nel fegato, allo scopo di rendere così il virus selettivo per le cellule del tessuto epatico. La specificità di G92A è stata dimostrata sia *in vitro* che *in vivo* in cui il virus ha dato prova di inibire selettivamente la crescita di tumori epatici subcutanei Hep3B ma non quelli umani prostatici PC3. Inoltre la somministrazione intraepatica del virus non risulta tossica come invece accade per il virus *wild type* KOS⁷⁵⁻⁷⁷. Recentemente è stato costruito anche il mutante dl2.CALP in cui il promotore di ICP4 è stato sostituito dal promotore della calponina per indirizzare la replicazione di VHS-1 nei tessuti molli e nei tumori ossei.

Il nostro gruppo nell'ambito di un progetto europeo THOVLEN (*Targeted Herpesvirus-derived Oncolytic Vectors for Liver cancer European Network*), si occupa dello sviluppo di vettori erpetici oncolitici sicuri ed efficienti, progettati per avere come bersaglio specifico il carcinoma epatocellulare (HCC), il tumore epatico più comune tra gli adulti.

Dati derivati da studi epidemiologici indicano che circa l'80% dei tumori epatici primari è rappresentato dall'HCC, che risulta inoltre essere uno dei tumori maligni prevalenti nel mondo. Il fegato è anche l'organo in cui si verificano più frequentemente delle metastasi dovute soprattutto a tumori gastrointestinali. Nonostante lo sviluppo di nuovi trattamenti terapeutici, la prognosi per l'HCC avanzato rimane molto bassa con una aspettativa di vita di circa 6 mesi dal momento della diagnosi. In tale contesto diventa necessaria la ricerca di nuove strategie terapeutiche e lo sviluppo di vettori erpetici rappresenta un promettente strumento terapeutico, sicuro e più efficace.

Risulta evidente che tali vettori dovranno presentare una combinazione di approcci di *targeting* verso l'HCC, sia a livello dell'ingresso del virus nella cellula ospite sia a livello dell'espressione genica e della replicazione ponendo geni essenziali sotto il controllo trascrizionale di promotori fegato o tumore-specifici.

Nei vettori basati su VHS-1 sono stati utilizzati diversi promotori tumore-specifici con incoraggianti risultati; tra questi solo il promotore dell'albumina ha mostrato selettività per il

fegato, compresi però gli epatociti sani, mentre il promotore B-myb attivato da E2F è attivo in molti tipi di tumore, compresi quelli del fegato. Altri promotori non ancora utilizzati per VHS-1, ed invece studiati nei vettori oncolitici adenovirali, comprendono: il promotore dell' α -fetoproteina (AFP) utilizzato perché l'AFP viene prodotta nel 70-80% dei pazienti con epatocarcinoma, ma non negli adulti sani⁷⁸; diversi promotori attivati da E2F, incluso il promotore costituzionale di questo gene⁷⁹; il promotore legato all'ipossia (HRE) che sembra essere attivo nella frazione solida del tumore⁸⁰ ed infine il promotore che controlla l'espressione della trascrittasi inversa della telomerasi umana (hTERT) attivo in tutte le cellule tumorali⁸¹.

La selettività verso i tessuti tumorali può avvenire anche a livello dell'entrata del virus nella cellula¹⁰; la modificazione del *targeting* avviene attraverso due *step* che comprendono l'alterazione dello spettro d'ospite del virus e il suo direzionamento verso un nuovo bersaglio.

Questo è stato già parzialmente conseguito nel nostro laboratorio con la costruzione del virus ricombinante KgBpK-gC:PreS1ap, in grado di riconoscere specificamente le cellule epatiche per la presenza della molecola di fusione gC:PreS1ap tra gC e PreSap, proteina derivante dal virus dell'epatite B (HBV). Vari dati hanno, infatti, identificato nella proteina S il responsabile dell'assorbimento del virus e approcci immunologici mediante uso di anticorpi monoclonali, hanno infine ristretto al peptide composto dagli aminoacidi 21-47 di preS1, la regione coinvolta nel legame agli epatociti⁸²⁻⁸⁵. Nonostante ciò il virus rimane infettivo anche per altri tipi cellulari dal momento che non è stato possibile eliminare completamente il legame alla cellula a causa della duplice funzione di gD, coinvolta sia nell'assorbimento che nella penetrazione, ma costituisce comunque un buon punto di partenza per la completa eliminazione del tropismo e il re-direzionamento agli epatociti.

SCOPO DELLA TESI

Lo scopo di questa tesi consiste nello sviluppo di vettori oncolitici, sicuri ed efficaci, basati sul virus dell'Herpes simplex di tipo 1 (VHS-1) opportunamente ingegnerizzato per avere come unico bersaglio il carcinoma epatocellulare (HCC).

L'HCC è il più comune tumore epatico dell'adulto e la terza causa di mortalità per cancro al mondo. VHS-1 è certamente una delle più promettenti piattaforme virali per lo sviluppo di vettori oncolitici innovativi come si può evidenziare dalle peculiari proprietà biologiche di questo virus e come confermato dai risultati incoraggianti ottenuti, in *trials* clinici, su pazienti con glioblastoma. La prima generazione di VHS oncolitici presenta comunque alcune limitazioni riguardanti l'efficacia e la sicurezza. Una nuova generazione di vettori erpetici migliorati nella potenza e nella sicurezza è pertanto necessaria prima che la strategia oncolitica basata su VHS-1 possa diventare un protocollo terapeutico affidabile contro i tumori.

La nostra ricerca si è pertanto indirizzata allo sviluppo di vettori dove non sono presenti delezioni in geni virali, il che comporterebbe una diminuzione in efficacia/potenza, ma geni opportuni vengono posti sotto il controllo trascrizionale di promotori tessuto/tumore specifici che favoriscono la replicazione virale nell'HCC. Questi vettori presenteranno strategie multiple di *targeting* all'HCC, sia a livello dell'entrata del virus nella cellula che a livello dell'espressione genica e della replicazione virale e saranno in grado di moltiplicarsi e diffondere solo nel tessuto tumorale senza causare danno nei tessuti normali sani.

Le diverse fasi sperimentali della nostra ricerca comporteranno:

- 1) La costruzione e la purificazione di virus erpetici ricombinanti in cui l'espressione della glicoproteina D (gD), essenziale per la replicazione virale, è posta sotto il controllo trascrizionale del promotore tumore specifico HRE indotto dall'ipossia o del promotore tessuto specifico del gene per l'albumina, EalbP- α 1AT, proteina altamente espressa nelle cellule epatiche.
- 2) L'inserimento nel genoma virale all'interno di regioni intergeniche non codificanti, di cassette di espressione di diversi geni *reporter* tra cui l'EGFP (*Enhanced Green Fluorescent Protein*), e la luciferasi.
- 3) L'analisi della capacità di crescita dei ricombinanti virali sia *in vitro*, utilizzando diverse linee cellulari, sia *in vivo* valutandone la tossicità e l'efficacia oncolitica nel modello murino.
- 4) La costruzione e la purificazione di virus erpetici ricombinanti modificati nel *targeting* recettoriale, in cui la sequenza che codifica per uno specifico ligando presente sul pericapside (regione PreSap) del virus dell'epatite B e in grado di riconoscere un

recettore presente sugli epatociti, è stata inserita *in frame* nella sequenza codificante la gD, glicoproteina responsabile dell'attacco di VHS alla membrana cellulare.

MATERIALI E METODI

COSTRUZIONE DEI PLASMIDI

I frammenti di DNA sono stati excisi con enzimi di restrizione della ditta New England Biolabs (NEB) e successivamente purificati da gel di agarosio dopo corsa elettroforetica mediante elettroeluizione con tubi da dialisi conservati in soluzione di sodio-azide ad una temperatura di 4°C; per le ligazioni è stato utilizzato l'enzima *T4 DNA ligasi* della ditta NEB. Parte della miscela di ligazione è stata utilizzata per trasformare batteri competenti *E. coli DH10B* (InvitroGen). Le colonie batteriche, contenenti i plasmidi ricombinanti di interesse, vengono amplificate ed in seguito i DNA plasmidici vengono estratti e purificati tramite *kit QIAGEN plasmid Maxi*.

PCR

I frammenti amplificati tramite PCR sono stati ottenuti utilizzando DNA plasmidico come template e gli oligonucleotidi elencati di seguito come *primers*; la regione di interesse è stata amplificata utilizzando la DNA polimerasi High-Fidelity (Phusion Hot Start, FINNZYMES) attraverso 35 cicli di reazione (98°C, 30 sec; 60°C, 60 sec; 72°C, 60 sec).

I *primers* utilizzati in questo lavoro sono i seguenti:

MontegD: FW: [5'- cataagcttcagcgcggaacgaccaact -3'] RW: [5'- cacgcgtctagagcggaccccatg -3']

gD: FW: [5'- gtccgctctagacgcgtgtaccacatc -3'] RW: [5'- ggtctccaagagggccgaatcct -3']

PreSlap: FW: [5'- gggcttagacctctgggattcttccc -3'] RW: [5'- gggcttagaggggtgaagtcccaatc -3']

Tutti i frammenti ottenuti tramite PCR sono stati sequenziati per verificarne la correttezza.

COLTURE CELLULARI

In questo lavoro sono state utilizzate le cellule Vero, linea fibroblastoide derivante da cellule renali di scimmia africana (ATCC, Rockville, MD; USA; CCL-81) e Vero-gD (cellule Vero modificate in modo da esprimere la glicoproteina D); le cellule sono state mantenute in sterilità a 37°C ed in atmosfera al 5% di CO₂, sono state coltivate in fiasche sterili con tappo provvisto di filtro (NUNC, Europe), in terreno essenziale modificato di Dulbecco (D-MEM, Euroclone UK) addizionato con l'1% di glutammina, l'1% di penicillina-streptomina e il 10% di siero fetale bovino (SFB). Le cellule Hep3B2 (cellule umane di carcinoma epatico, Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Lombardia e dell'Emilia Romagna, Italia) e le cellule HuH-7 (cellule umane

di epatocarcinoma, Hyclone, Logan, UT, USA) vengono mantenute in terreno essenziale di Dulbecco contenente Sali di *Earle* (MEM-Earle) addizionato con il 10% di SFB, l'1% di glutammina, l'1% di penicillina-streptomicina e l'1% di aminoacidi non essenziali (NEAA). Tutti i virus mutanti e ricombinanti utilizzati derivano dal ceppo sinciziale HVEM di VHS-1, chiamato H6.

COSTRUZIONE E ISOLAMENTO DEI VIRUS RICOMBINANTI

I virus ricombinanti sono stati costruiti utilizzando metodiche standard di *marker transfer/marker rescue* utilizzando LipofectAmine (*Invitrogen-Life Technologies*) per le co-trasfezioni. I ricombinanti virali sono stati purificati mediante tre cicli di *limiting dilution* prima della loro caratterizzazione. Per costruire i virus ricombinanti H6-HREgD e H6-EalbPgD, monostrati di cellule Hep3B2 sono state co-trasfettate con il DNA plasmidico pTZ-BamJ-HREgD o con il DNA plasmidico pTZ-BamJ-EalbPgD e con il DNA del mutante virale H6- Δ gD:EGFP contenente il gene per la proteina fluorescente EGFP, (*Enhanced Green Fluorescent Protein*), al posto della sequenza US6 codificante per la glicoproteina D (gD). I virus ricombinanti H6-HREgD e H6-EalbPgD sono stati identificati per il loro fenotipo a placche chiare.

Per l'inserimento delle diverse cassette di espressione EGFP e luciferasi, ci si è basati sul sistema di costruzione già messo a punto in precedenza detto "sistema *PacI*"⁸⁶. Questa tecnica è stata ideata per favorire la percentuale di virioni ricombinanti negli esperimenti di co-trasfezione e si basa sulla mancanza del sito di restrizione per *PacI* nel genoma di HSV-1. Il sistema consiste in due fasi; in primo luogo, si crea la delezione del locus prescelto mediante l'inserimento, nel genoma del vettore, del gene *reporter* EGFP fiancheggiato da siti *PacI*. Grazie alla presenza ai lati del gene *reporter* di un particolare enzima di restrizione, non presente nel genoma *wild type* (*wt*) di VHS-1, è possibile in seguito excidere tale gene facilitando l'inserzione di un secondo gene *reporter*, come la luciferasi, precedentemente clonato in un plasmide contenente le stesse sequenze fiancheggianti, ottenendo una percentuale di successo molto più alta rispetto ad una ricombinazione diretta tra gene esogeno e DNA virale. Tutti i ricombinanti virali sono stati purificati mediante tre cicli di diluizione limite e dopo ogni ciclo di purificazione, i DNA di tali virus sono stati sottoposti ad analisi mediante *Southern Blot*.

TITOLAZIONE VIRALE

Il titolo degli *stock* virali è stato determinato come segue: diluizioni seriali di virus sono state messe a contatto con cellule Vero, seminate il giorno precedente in piastre da 6 pozzetti in modo da ottenere circa 1×10^6 cellule per pozzetto; dopo 1 ora di incubazione a 37°C in agitazione, il terreno contenente il virus è stato eliminato ed è stato sostituito con terreno contenente l'1% di SFB e il 2% di γ -globuline umane che evitano la formazione di placche secondarie. Le placche formate dalle singole particelle virali sono state controllate al microscopio e dopo circa 48 ore le cellule sono state fissate e colorate con cristalvioletto (1% cristalvioletto; 70% metanolo) e le placche formate sono state contate. Il saggio di titolazione è stato condotto in duplicato ed il titolo virale, espresso in pfu (unità formanti placca)/ml, è stato calcolato facendo la media dei risultati ottenuti.

LIMITING DILUTION

Questa tecnica viene utilizzata per purificare un singolo virione da una popolazione mista. In genere si usa per isolare i virus ricombinanti formati in seguito ad una co-trasfezione. Si titola perfettamente lo stock virale:

- si infettano 2×10^6 cellule Hep3B2 in sospensione con 0,3, 3 e 30 pfu di virus, in un volume di circa 2 ml;

- dopo 1-2 ore a 37°C si porta il volume a 15 ml;

- si distribuiscono le cellule infettate in piastre da 96 pozzetti e si incubano a 37°C .

Le piastre vengono controllate ogni giorno. Quando si osservano dei pozzetti infettati, se ne preleva il surnatante, contenente il virus, e lo si conserva a -80°C . Per i virus contenenti proteine fluorescenti, le placche sono state osservate anche al microscopio a fluorescenza. Per purificare un virus ricombinante sono in genere necessari 3 cicli di *limiting dilution*. Al termine di ogni ciclo i DNA virali sono sottoposti ad analisi mediante *Southern Blot*.

SOUTHERN BLOT

Sono state infettate $2,5 \times 10^5$ cellule Vero ad una molteplicità di infezione (MOI) di 1 pfu/cellula con i virus provenienti dalle *limiting dilution*; alla comparsa dell'infezione (dopo 24-36 ore), i campioni sono stati raccolti, risospesi in tampone di lisi (tris 10mM, EDTA 1mM, SDS 0,6%, proteinasi K 0,1 mg/ml) e posti *over night* a 37°C . Il DNA virale è stato estratto con fenolo/cloroformio/alcool isoamilico (25:24:1), precipitato con etanolo e risospeso in acqua.

Quindi, dopo digestione con opportuni enzimi di restrizione, è stato fatto migrare su gel di agarosio allo 0,8% e trasferito su membrana di nitrocellulosa (Nytran Plus, Schleicher & Schuell); la membrana è stata sottoposta ad ibridazione a 42°C con sonde non radioattive (RPN3005, GE Healthcare, Italia) corrispondenti al gene di interesse e al *locus* virale in cui è stato inserito. Lo sviluppo su lastra autoradiografica è avvenuto dopo trattamento della membrana con ECL (Pierce, Italia).

CAPACITÀ DI CRESCITA DEI VIRUS IN DIVERSE LINEE CELLULARI

Cellule Vero, Hep3B2 e HuH-7 vengono pilastrate in 24 *well* il giorno prima ad una concentrazione di $1,25 \times 10^5$ cellule/*well* e sono state poi infettate, in duplicato, ad una molteplicità di infezione (MOI) di 1 e 0,1 pfu/cellula con i virus ricombinanti e quello parentale utilizzato come controllo. I campioni sono stati raccolti a 24, 48 e 72 ore dall'infezione. Per ogni campione si sono effettuati tre cicli di congelamento e scongelamento per permettere il rilascio del virus dalle cellule. Infine i campioni vengono sonicati e la quantità di virus prodotto viene determinata mediante titolazione su cellule Hep3B2. Tutte le linee cellulari sono state mantenute in terreno MEM-Earle per evitare eventuali differenze di crescita.

PROTEINA FLUORESCENTE

La *Enhanced Green Fluorescent Protein* (EGFP) utilizzata come gene *reporter* per la costruzione dei ricombinanti virali, è una variante della proteina verde *wild-type* (GFP) isolata dalla medusa *Aequorea victoria*. Il gene EGFP deriva dal plasmide commerciale pIRES-EGFP della ditta Clontech. Lo *screening* dei virus contenenti la proteina è stato fatto mediante l'utilizzo di un microscopio a fluorescenza NIKON Eclipse TE2000-S; la EGFP è visibile alle lunghezze d'onda comprese tra 488 e 509 nm.

SAGGIO DELLA LUCIFERASI

Cellule Hep3B2 sono state infettate in piastre da 96 pozzetti con i virus esprimenti la luciferasi. Ad infezione avanzata i pozzetti sono stati trattati come segue: il surnatante è stato trasferito in una piastra replica e conservato a -80°C come riserva di virus, mentre le cellule infettate presenti nel pozzetto (circa 4×10^4 cellule per pozzetto) sono state messe a contatto con un *buffer* di lisi (*Cell Culture Lysis Reagent*, CCLR Promega) per 10 minuti a temperatura

ambiente. Il lisato cellulare è stato trasferito in una piastra da 96 pozzetti opaca (3651, CORNING), necessaria per la successiva lettura al luminometro ed in ogni pozzetto è stato aggiunto il substrato contenente la luciferina (*Luciferase assay system*, E4550 Promega). La lettura è stata effettuata al luminometro (VICTOR³ *Multilabel Plate Counter*, PerkinElmer USA) ad una lunghezza d'onda di 562 nm, per un tempo di 5 secondi per pozzetto; i dati vengono espressi in numero di fotoni/secondo. Il test è stato eseguito sui campioni isolati dopo ogni ciclo di *limiting dilution*. Il gene della luciferasi (*firefly luciferase*) è stato exciso dal plasmide pGL3-Basic (Promega)

PURIFICAZIONE SU GRADIENTE DEGLI STOCK VIRALI

Le cellule Vero contenute in 20-25 fiasche (T175, NUNC) sono state infettate con i ricombinanti virali e lasciate in incubazione a 37°C fino al raggiungimento dell'effetto citopatico completo; il virus è stato raccolto e centrifugato a 20000 rpm (rotazioni per minuto) per ottenere un *pellet* virale concentrato. Il vettore è stato quindi purificato tramite gradiente di densità utilizzando una soluzione contenente iodixanolo (OptiPrep, Sentinel Diagnostics), risospeso in D-PBS (Dulbecco's Phosphate Buffered Saline, EuroClone) e conservato a -80°C.

ANIMALI

Gli esperimenti *in vivo* sono stati condotti nei laboratori del dr. Hernandez-Alcoceba presso l'Università di Navarra a Pamplona, Spagna. Per tutti gli esperimenti è stato utilizzato un ceppo murino di topi nudi atimici.

Sono stati effettuati test di tossicità, di monitoraggio dell'attività luciferasica nel tempo e di attività antitumorale. Per il test di tossicità sono state effettuate singole iniezioni intravenose con 3×10^5 pfu dei virus H6-HREgD-IGR20:Hluc, H6-EalbPgD-IGR20:Hluc e H6-IGR20:Hluc. Per monitorare l'espressione della luciferasi e testare l'attività antitumorale, invece, sono stati precedentemente realizzati degli impianti sottocutanei di 10^7 cellule di epatocarcinoma umano (HuH-7) nel fianco degli animali ed in seguito si sono effettuate singole iniezioni intratumorali con 1×10^5 pfu dei virus ricombinanti e il virus parentale come controllo.

RISULTATI

COSTRUZIONE DI VHS ONCOLITICI MODIFICATI NEL *TARGETING* TRASCRIZIONALE

Per costruire un vettore oncolitico basato sul virus dell'Herpes Simplex di tipo 1 (VHS-1) con caratteristiche di efficacia e sicurezza per la cura del carcinoma epatocellulare (HCC) l'approccio fondamentale è quello di modificare sia il suo *targeting* replicativo che quello recettoriale, per ottenere un virus la cui virulenza sia attenuata nei tessuti sani e normali, ma che sia in grado di distruggere efficientemente le cellule tumorali.

Per conferire al virus la capacità di replicarsi solamente in cellule tumorali epatiche, la prima fase del progetto si è basata sulla costruzione di virus erpetici ricombinanti in cui l'espressione della glicoproteina D (gD), essenziale per la replicazione del virus e coinvolta nei meccanismi di adsorbimento, fusione e ingresso nella cellula ospite, sia posta sotto il controllo trascrizionale o di un promotore tumore specifico indotto dall'ipossia (*Hypoxia Response Element-HRE*) condizione che si realizza nella porzione solida dei tumori, o del promotore tessuto specifico del gene dell'albumina, (EalbP- α 1AT), proteina altamente espressa nelle cellule epatiche. Tali ricombinanti sono stati costruiti a partire da un mutante sinciziale derivato dal ceppo HVEM di VHS-1, chiamato H6, nel quale era stata precedentemente deleta una porzione del gene US6 codificante la gD è sostituita da un marcatore fenotipico, EGFP (*Enhanced Green Fluorescent Protein*). L'espressione di EGFP, insieme alla crescita selettiva del virus in una linea cellulare complementante esprimente gD, è stata utilizzata come marcatore fenotipico per l'isolamento del mutante virale (figura 6). La scelta di utilizzare un virus dal fenotipo sinciziale come base per la costruzione dei vari ricombinanti è stata motivata dal fatto che diversi studi hanno dimostrato che i virus con fenotipo sinciziale hanno una maggiore capacità oncolitica.

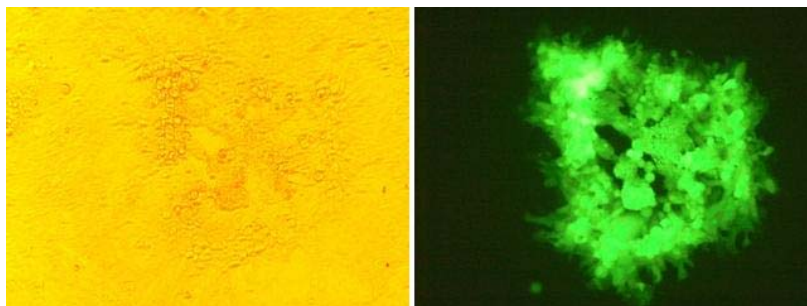


Figura 6. Placca di lisi del virus H6- Δ gD:EGFP. A sinistra si osserva la placca di lisi visualizzata al microscopio a contrasto di fase. A destra si osserva la stessa placca esposta ad un fascio di luce UV.

Per porre l'espressione di gD sotto il controllo trascrizionale del promotore HRE o EalbP- α 1AT, è necessario prima di tutto costruire i plasmidi, pTZ-BamJ-HREgD e pTZ-BamJ-EalbPgD, nei quali la sequenza del promotore di gD viene sostituita da HRE e EalbP, ed in seguito utilizzare tali costrutti per restituire la sequenza US6, controllato dal promotore specifico, al virus H6- Δ gD:EGFP con successiva purificazione dei ricombinanti H6-HREgD e H6-EalbPgD.

A) Costruzione dei plasmidi codificanti la glicoproteina D sotto il controllo di promotori tumore specifico o tessuto specifico

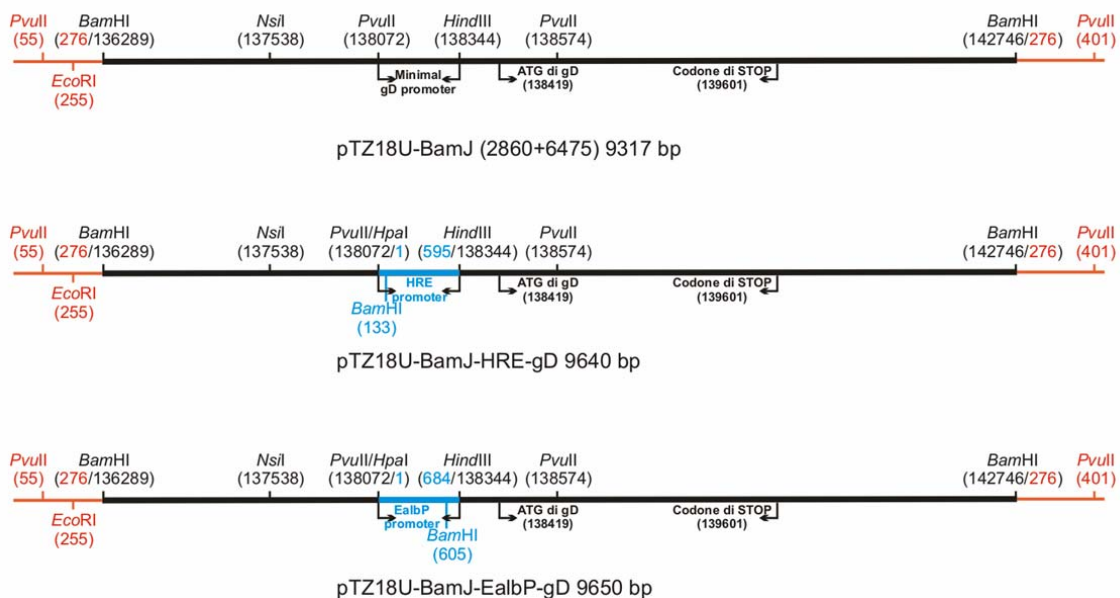


Figura 7. Strutture dei plasmidi pTZ18U-BamJ, pTZ18U-BamJ-HREgD e pTZ18U-BamJ-EalbPgD.

(A) Struttura del plasmide pTZ18U-BamJ (9317 bp). Sono indicate in rosso le sequenze derivate dal plasmide pTZ18U (2860 bp), in nero il frammento BamHI J del genoma di HSV-1 (6475 bp). (B); (C) Struttura del plasmide pTZ18U-BamJ-HREgD (9640 bp) e del plasmide pTZ18U-BamJ-EalbPgD (9650 bp). Sono indicati in rosso il plasmide pTZ18U, in nero il frammento BamHI J del genoma di HSV-1 e in blu le sequenze del promotore ipossia-inducibile HRE e del promotore dell'albumina EalbP. Nella figura sono riportati i siti di riconoscimento per le endonucleasi di restrizione utilizzate negli esperimenti di clonaggio e di *Southern Blot*.

La sequenza del promotore HRE è stata ottenuta mediante digestione del plasmide 9XHIF con le endonucleasi di restrizione *Hpa-HindIII*, e conseguente purificazione mediante elettroeluzione di una banda di 595 bp, mentre la sequenza del promotore EalbP è stata ottenuta excidendo dal plasmide EalbP α -luc un frammento di 684 bp con le endonucleasi di restrizione *XhoI-HindIII* e conseguente elettroeluzione.

Studi di bibliografia hanno dimostrato che la delezione della sequenza *PvuII* (138072)-*HindIII* (138344) del genoma di VHS-1 determina la rimozione delle sequenze promotore di US6.

In precedenza nel nostro laboratorio è stato costruito il plasmide pTZ-BamJ (9317 bp figura 7) clonando il frammento *BamHI* J (136289-142746) del genoma di VHS-1 nel sito *BamHI* del plasmide pTZ18U.

Come si può osservare in figura 7, in tale costrutto sono presenti tre siti di riconoscimento per l'endonucleasi di restrizione *PvuII* quindi, per poter excidere la sola sequenza di interesse ed inserire quelle del promotore HRE o del promotore EalbP è stata attuata la seguente strategia. Il plasmide pTZ18U-BamJ è stato digerito con le endonucleasi di restrizione *NsiI* (137538)-*HindIII* (138072) e il frammento di 8511 bp è stato purificato mediante elettroeluzione. Lo stesso plasmide è stato inoltre digerito con le endonucleasi di restrizione *NsiI* (137538)-*PvuII* (138072), con successiva purificazione del frammento di 534 bp. A questo punto i frammenti HRE con estremità *HpaI-HindIII* di 595 bp, *NsiI-HindIII* di 8511 bp e *NsiI-PvuII* di 534 bp sono stati ligati insieme per ottenere il plasmide pTZ-BamJ-HREgD. I tre frammenti si possono ligare in una sola direzione sfruttando la compatibilità delle estremità *HindIII-HindIII*, *NsiI-NsiI* e *HpaI-PvuII*, queste ultime entrambe piatte. Il frammento *XhoI-HindIII*, invece, contenente la sequenza del promotore dell'albumina, una volta resa piatta l'estremità *XhoI* è stato utilizzato nello stesso tipo di ligazione per ottenere il plasmide pTZ-BamJ-EalbPgD. I due plasmidi così ottenuti sono stati utilizzati nei successivi esperimenti di ricombinazione omologa.

B) Costruzione dei virus ricombinanti H6-HREgD e H6-EalbPgD

I virus ricombinanti H6-HREgD e H6-EalbP-gD sono stati ottenuti per ricombinazione omologa in seguito a co-trasfezione dei DNA plasmidici pTZ-BamJ-HREgD e pTZ-BamJ-EalbPgD con il DNA virale H6- Δ gD:EGFP in cellule umane di carcinoma epatico Hep3B2 (figura 8). I virioni ottenuti sono stati titolati in cellule Vero, Vero-gD e in cellule Hep3B2. Oltre alla presenza del marcatore fenotipico a placche sinciziali "bianche", la replicazione dei virus ricombinanti H6-HREgD e H6-EalbP-gD viene favorita su cellule Hep3B2, dove non possono crescere virus deleti in gD. I ricombinanti virali sono stati purificati mediante tre cicli di *limiting dilution* e, successivamente ad ogni ciclo, i DNA genomici estratti sono stati analizzati mediante *Southern Blot* per confermare il genotipo modificato. In fig. 9 è riportato il *Southern Blot* successivo al 3° ciclo di *limiting dilution*.

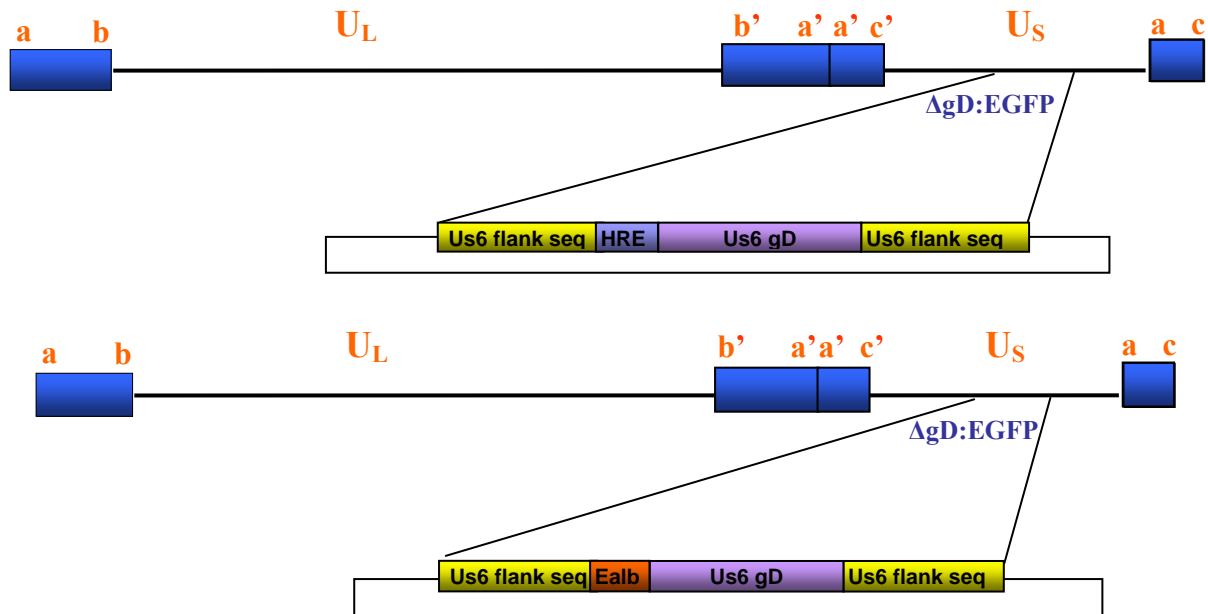


Figura 8. Rappresentazione schematica della ricombinazione omologa per la costruzione dei virus ricombinanti H6-HREgD e H6-EalbPgD. I DNA plasmidici pTZ18U-BamJ-HREgD e pTZ18U-BamJ-EalbPgD presentano regioni di omologia (US6 *flank seq*) con il DNA del virus parentale H6-ΔgD:EGFP, a livello delle quali avverrà la ricombinazione omologa che permetterà di sostituire il gene codificante per EGFP con il gene US6 posto sotto il controllo trascrizionale del promotore HRE o del promotore dell'albumina.

I DNA virali estratti dai virus ricombinanti H6-HREgD sono stati digeriti con le endonucleasi di restrizione *Bam*HI e analizzati mediante *Southern Blot* utilizzando una sonda specifica per HRE ed una sonda specifica per il promotore di gD, per confermare l'inserimento della sequenza del promotore dell'ipossia e la contemporanea delezione del promotore di gD. L'endonucleasi di restrizione *Bam*HI taglia una volta all'interno della sequenza HRE dando quindi origine alla formazione di due bande nella corrispondente zona del genoma, mentre non taglia nella sequenza promotore di gD. La sonda corrispondente al promotore di gD ibridizza con un frammento di 6475 bp, contenente la gD *wild type* (*wt*), nel virus H6 di controllo e con un frammento di 3748 bp nel virus H6-ΔgD:EGFP dove la sequenza promotore di gD è presente. La stessa sonda, come atteso, non è in grado di rilevare alcuna banda nel virus ricombinante H6-HREgD e nel DNA plasmidico di controllo pTZ-BamJ-HREgD (dati non riportati). Come si può notare in figura 9 (pannello A profilo: 4, 5, 6), la sonda specifica per HRE ibridizza con due frammenti di 4887 bp e 1916 bp, contenenti la sequenza HRE, nel DNA dei virus ricombinanti ma non ibridizza con alcun frammento nei virus di controllo H6 e H6-ΔgD:EGFP (pannello A, profilo: 2, 3).

I DNA virali estratti dai virus ricombinanti H6-EalbPgD sono stati digeriti come quelli precedenti con l'endonucleasi *Bam*HI che taglia una volta all'interno della sequenza EalbP, dando origine alla formazione di due bande nella corrispondente zona del genoma, mentre non

taglia nella sequenza promotore di gD. I DNA digeriti sono stati analizzati mediante *Southern Blot* utilizzando una sonda specifica per EalbP ed una sonda specifica per il promotore di gD. La sonda corrispondente al promotore di gD presenta gli stessi risultati sopra descritti (dati non riportati) mentre quella specifica per EalbP ibridizza con due frammenti di 2388 bp e 4503 bp, contenenti la sequenza EalbP, nel DNA dei virus ricombinanti (pannello B, profilo: 1, 2, 3, 4) ma non ibridizza con alcun frammento nei virus di controllo H6 e H6- Δ gD:EGFP (pannello B, profilo:5, 6).

Questi dati dimostrano che i virus H6-HREgD e H6-EalbPgD oltre ad essere deleti della sequenza promotore di gD, contengono al suo posto rispettivamente le sequenze HRE e EalbP.

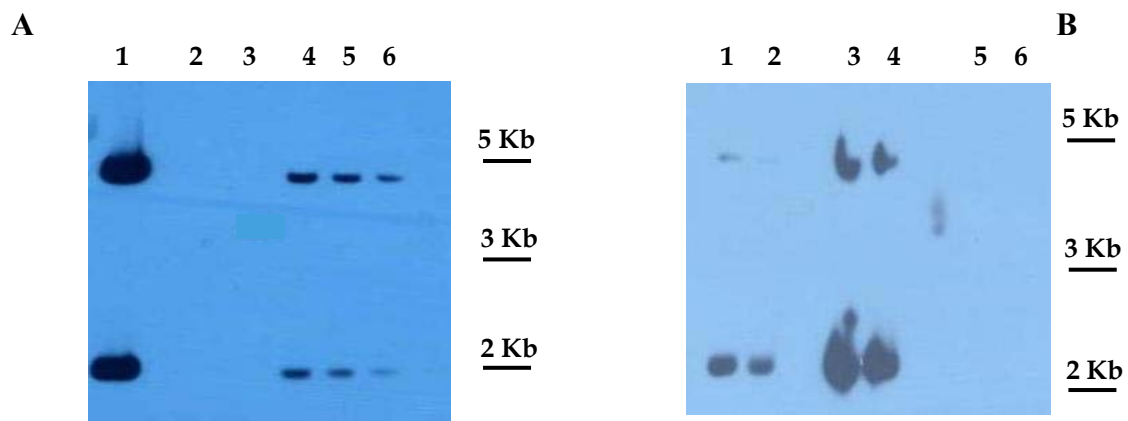


Figura 9. Analisi mediante *Southern Blot* dei ricombinanti H6-HREgD (pannello A) e H6-EalbP-gD (pannello B) dopo il terzo ciclo di *limiting dilution* utilizzando una sonda specifica per il promotore tumore specifico HRE (A) e una sonda specifica per il promotore dell'albumina EalbP (B). **Pannello A:** La sonda specifica per HRE ibridizza con due frammenti di 4887 bp e 1916 bp, contenenti la sequenza HRE, nel DNA dei virus ricombinanti (profilo 4, 5 e 6) e con il plasmide di controllo pTZ-BamJ-HREgD (profilo 1), ma non ibridizza con alcun frammento nei virus di controllo H6 e H6- Δ gD:EGFP (profilo 2 e 3). **Pannello B.** La sonda specifica per EalbP ibridizza con due frammenti di 2388 bp e 4503 bp, contenenti la sequenza EalbP, nel DNA dei virus ricombinanti (profilo 1, 2, 3 e 4) ma non ibridizza con alcun frammento nei virus di controllo H6 e H6- Δ gD:EGFP (profilo 5 e 6).

COSTRUZIONE DI VHS RICOMBINANTI CONTENENTI GENI *REPORTER* ALL'INTERNO DI REGIONI INTERGENICHE

A) Regione intergenica IGR20

Per poter analizzare la capacità di crescita dei virus ricombinanti sia *in vitro*, utilizzando diverse linee cellulari, sia *in vivo* valutandone la tossicità e l'efficacia oncolitica nel modello murino, sono stati inseriti nel genoma virale dei geni *reporter* quali l'EGFP e la luciferasi. Le cassette di espressione contenenti i geni *reporter*, posti sotto il controllo trascrizionale del promotore precocissimo del citomegalovirus umano (HCMV), sono state clonate all'interno di

sequenze di VHS-1 che corrispondono a regioni non codificanti dette regioni intergeniche (*intergenic region-IGR*), in modo tale da non interrompere nessun gene virale, e quindi non alterare troppo la virulenza e mantenere un'alta tossicità per le cellule bersaglio. In particolare, è stata scelta per l'inserimento dei geni *reporter* la regione IGR20, una sequenza non codificante di circa 600 bp compresa tra il gene UL26.5 che codifica per la proteina capsidica VP22, e il gene UL27, che codifica per la glicoproteina B.

La costruzione dei vettori contenenti l'inserzione dei geni per l'EGFP e la luciferasi nella IGR20 è avvenuta in due fasi: nella prima è stato necessario modificare il genoma dei virus ricombinanti H6-HREgD e H6-EalbPgD utilizzando il gene *reporter* EGFP fiancheggiato dai siti di restrizione *PacI*, che permette un rapido *screening* dei ricombinanti virali; la seconda fase ha previsto la sostituzione di questo gene con quello della luciferasi, un gene *reporter* che permette di osservare la biodistribuzione e la replicazione del vettore *in vivo* senza sacrificare l'animale. L'inserimento della luciferasi al posto della EGFP è avvenuto in maniera molto efficiente grazie al "sistema *PacI*", che si basa sulla mancanza del sito di restrizione per *PacI* nel genoma di VHS-1, mancanza che permette quindi di excidere in maniera selettiva il gene *reporter* attraverso una digestione enzimatica con una percentuale di successo nell'inserimento del nuovo transgene molto più elevata rispetto ad una ricombinazione diretta tra gene esogeno e DNA virale, come descritto dettagliatamente in "Materiali e Metodi".

B) Costruzione e purificazione dei virus H6-HREgD-IGR20:EGFP e H6-EalbPgD-IGR20:EGFP

I virus ricombinanti H6-HREgD-IGR20:EGFP e H6-EalbPgD-IGR20:EGFP sono stati costruiti per ricombinazione omologa in seguito a co-trasfezione del DNA plasmidico IGR20:HE con i DNA virali H6-HREgD e H6-EalbPgD in cellule Hep3B2. Il plasmide IGR20:HE, costruito precedentemente nel nostro laboratorio, contiene la cassetta trascrizionale HCMV-EGFP fiancheggiata da siti di riconoscimento per l'endonucleasi di restrizione *PacI*, all'interno dell'IGR20. È stato possibile valutare la presenza di virus ricombinanti contenenti il gene *reporter*, grazie alla presenza della proteina fluorescente verde che ha permesso di isolare la placche virali contenenti l'EGFP da quelle bianche del virus parentale.

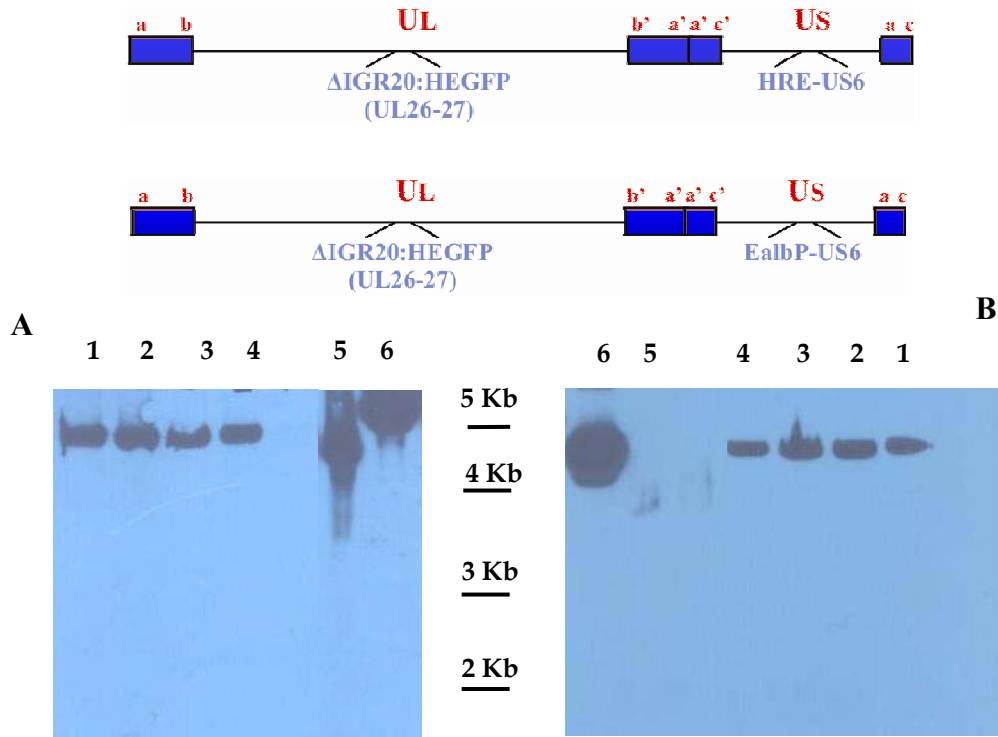


Figura 10. Sopra: Rappresentazione schematica dei virus ricombinanti H6-HREgD-IGR20:EGFP e H6-EalbPgD-IGR20:EGFP. **Sotto:** Analisi mediante *Southern Blot* dei DNA virali dei ricombinanti H6-HREgD-IGR20:EGFP e H6-EalbPgD-IGR20:EGFP dopo il terzo ciclo di *limiting dilution* utilizzando una sonda che riconosce una parte della sequenza del genoma di VHS-1 corrispondente all'IGR20 (**pannello A**) e una sonda specifica per EGFP (**pannello B**). **Pannello A:** la sonda corrispondente all'IGR20 ibridizza con un frammento di 4849 bp, contenente la sequenza EGFP, nei virus H6-HREgD-IGR20:EGFP (profilo 1 e 2) e H6-EalbPgD-IGR20:EGFP (profilo 3 e 4) e nel plasmide IGR20:EGFP (profilo 6) mentre nel DNA del virus *wt* (H6; profilo 5) la sonda relativa all'IGR20 ibridizza con il frammento di 4230 bp. **Pannello B:** La sonda corrispondente a EGFP ibridizza con un frammento di 4849 bp, contenente la sequenza EGFP nei virus ricombinanti H6-HREgD-IGR20:EGFP (profilo 1 e 2) e H6-EalbPgD-IGR20:EGFP (profilo 3 e 4) nel plasmide IGR20:EGFP (profilo 6), mentre non è in grado di rilevare alcuna banda nel virus *wt* H6 (profilo 5).

I ricombinanti virali sono stati purificati mediante tre cicli di *limiting dilution* e i DNA genomici estratti sono stati poi analizzati mediante *Southern Blot* per confermare il corretto inserimento del gene *reporter*. I DNA virali dei virus ricombinanti H6-HREgD-IGR20:EGFP e H6-EalbPgD-IGR20:EGFP così come quello del virus di controllo *wt* H6 sono stati digeriti con l'endonucleasi di restrizione *XhoI*. L'endonucleasi di restrizione *XhoI* taglia una volta all'interno della IGR20 e una volta all'interno della sequenza EGFP dando quindi origine alla formazione di due bande (813 bp e 4849 bp) nella corrispondente zona del genoma dei virus H6-HREgD-IGR20:EGFP e H6-EalbPgD-IGR20:EGFP, e una sola banda (4230 bp) nella corrispondente zona del genoma del virus *wt*. I campioni digeriti sono stati analizzati tramite *Southern Blot* utilizzando, in parallelo, una sonda diretta contro EGFP di 694 bp e una sonda di 537 bp che riconosce una parte della sequenza del genoma di VHS-1 corrispondente all'IGR20. Le bande ottenute dopo lo sviluppo delle membrane, hanno confermato il corretto inserimento del gene

EGFP nella regione IGR20. Infatti, come si può notare dalle lastre autoradiografiche in figura 10 la sonda corrispondente a EGFP e quella corrispondente all'IGR20 ibridizzano con un frammento di 4849 bp, contenente la sequenza EGFP, nei virus H6-HREgD-IGR20:EGFP e H6-EalbPgD-IGR20:EGFP mentre nel DNA del virus *wt* la sonda relativa all'IGR20 ibridizza con il frammento di 4230 bp.

C) Costruzione e purificazione dei virus H6-HREgD-IGR20:Hluc e H6-EalbPgD-IGR20:Hluc

Per ottenere i virus ricombinanti H6-HREgD-IGR20:Hluc e H6-EalbPgD-IGR20:Hluc i DNA virali H6-HREgD-IGR20:EGFP e H6-EalbPgD-IGR20:EGFP, dopo essere stati digeriti con l'endonucleasi di restrizione *PacI*, sono stati co-transfettati con il plasmide IGR20:Hluc. Questo plasmide, costruito precedentemente nel nostro laboratorio, contiene la cassetta trascrizionale HCMV-Hluc all'interno dell'IGR20. Attraverso un evento di ricombinazione omologa favorito dalla perdita del gene EGFP, in seguito alla digestione con *PacI*, sono stati ottenuti i virus ricombinanti H6-HREgD-IGR20:Hluc e H6-EalbPgD-IGR20:Hluc, contenenti la sequenza codificante la luciferasi nella IGR20 (fig. 11). Un primo *screening* dei vettori ricombinanti al microscopio a fluorescenza, ha permesso di isolare le placche con fenotipo bianco, che probabilmente contenevano il nuovo gene, da quelle verdi che avevano mantenuto EGFP.

I virus isolati in questo primo ciclo di *limiting dilution*, sono stati sottoposti al saggio della luciferasi, che sfrutta la capacità di questa proteina di emettere luce se messa a contatto con un substrato contenente luciferina. I campioni risultati positivi al saggio per la luciferasi, sono stati quindi sottoposti ad altri due cicli di purificazione e successivamente i DNA virali digeriti sono stati analizzati mediante *Southern Blot* per verificare il corretto inserimento del gene *reporter* nel genoma erpetico.

I DNA virali dei virus ricombinanti H6-HREgD-IGR20:Hluc e H6-EalbPgD-IGR20:Hluc così come quello del virus di controllo *wt* H6 sono stati digeriti con l'endonucleasi di restrizione *KpnI*. L'endonucleasi di restrizione *KpnI* taglia una volta all'interno della IGR20 e una volta all'interno della sequenza Hluc dando quindi origine alla formazione di due bande (204 bp e 7185 bp) nella corrispondente zona del genoma dei virus H6-HREgD-IGR20:Hluc e H6-EalbPgD-IGR20:Hluc. I campioni digeriti sono stati analizzati tramite *Southern Blot* utilizzando, in parallelo, una sonda diretta contro Hluc di 271 bp e una sonda di 537 bp che riconosce la sequenza corrispondente alla IGR20 di VHS-1. Le bande ottenute dopo lo sviluppo delle membrane, hanno confermato il corretto inserimento del gene Hluc nella regione IGR20, come mostra la fig. 11. Infatti, come si può notare dalle lastre autoradiografiche la sonda

corrispondente a Hluc ibridizza solo con un frammento di 7185 bp, contenente la sequenza Hluc, nel DNA dei virus ricombinanti, mentre quella relativa all'IGR20 ibridizza sia con i due frammenti di 204 bp e 7185 bp, che con il frammento di 4701 bp contenente la sequenza relativa all'IGR20 nel DNA del virus *wt*.

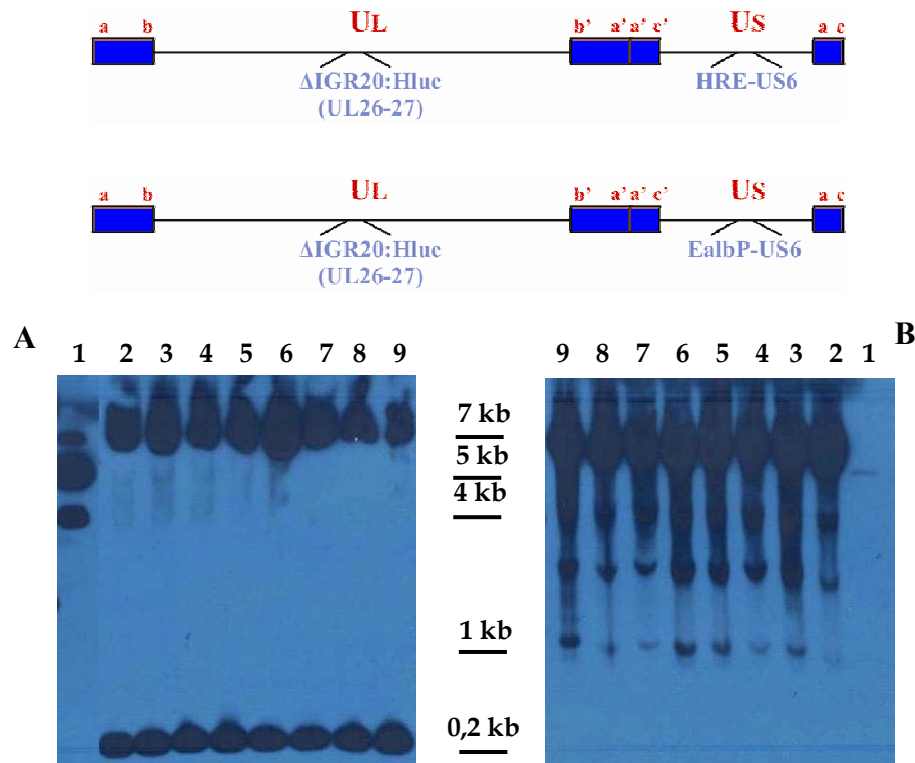


Figura 11. Sopra: Rappresentazione schematica dei virus ricombinanti H6-HREgD-IGR20:Hluc e H6-EalbPgD-IGR20:Hluc. **Sotto:** Analisi mediante *Southern Blot* dei DNA virali relativi ai ricombinanti H6-HREgD-IGR20:Hluc e H6-EalbPgD-IGR20:Hluc dopo il terzo ciclo di *limiting dilution* utilizzando una sonda che riconosce una parte della sequenza del genoma di VHS-1 corrispondente all'IGR20 (**pannello A**) e una sonda specifica per la luciferasi, Hluc (**pannello B**). **Pannello A:** la sonda corrispondente all'IGR20 ibridizza con due frammenti di 204 bp e 7185 bp nel DNA dei virus ricombinanti H6-HREgD-IGR20:Hluc (profilo 2, 3, 4 e 5) e H6-EalbPgD-IGR20:EGFP (profilo 6, 7, 8 e 9) e con il frammento di 4701 bp contenente la sequenza relativa all'IGR20 nel DNA del virus *wt* H6 (profilo 1). **Pannello B:** La sonda corrispondente a Hluc ibridizza solo con un frammento di 7185 bp, contenente la sequenza Hluc, nel DNA dei virus ricombinanti H6-HREgD-IGR20:Hluc (profilo 2, 3, 4 e 5) e H6-EalbPgD-IGR20:EGFP (profilo 6, 7, 8 e 9), mentre non è in grado di rilevare alcuna banda nel virus *wt* H6 (profilo 1).

Utilizzando le stesse metodiche è stato anche costruito il virus H6-IGR20:Hluc da utilizzare come controllo nei successivi saggi *in vitro* e *in vivo*.

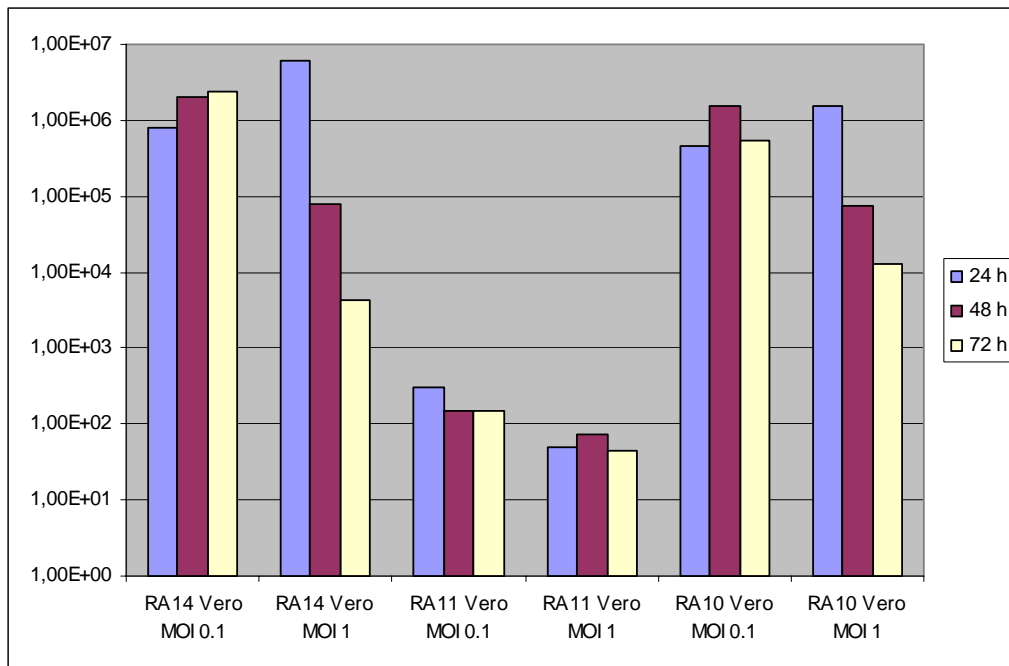
I dati ottenuti in seguito al 3° ciclo di *limiting dilution* ci hanno permesso di selezionare tre virus ricombinanti H6-HREgD-IGR20:Hluc, H6-EalbPgD-IGR20:Hluc e H6-IGR20:Hluc puri, da utilizzare per preparare un maxi stock di virus ricombinante. Gli stock virali sono stati sottoposti a purificazione su gradiente di iodixanolo (opti prep) per poter essere utilizzati nei successivi test *in vivo* presso i laboratori del dr. Hernandez-Alcoceba in Spagna.

CAPACITÀ DI CRESCITA IN DIVERSE LINEE CELLULARI DEI VIRUS H6-HREgD-IGR20:HLuc E H6-EalbPgD-IGR20:HLuc

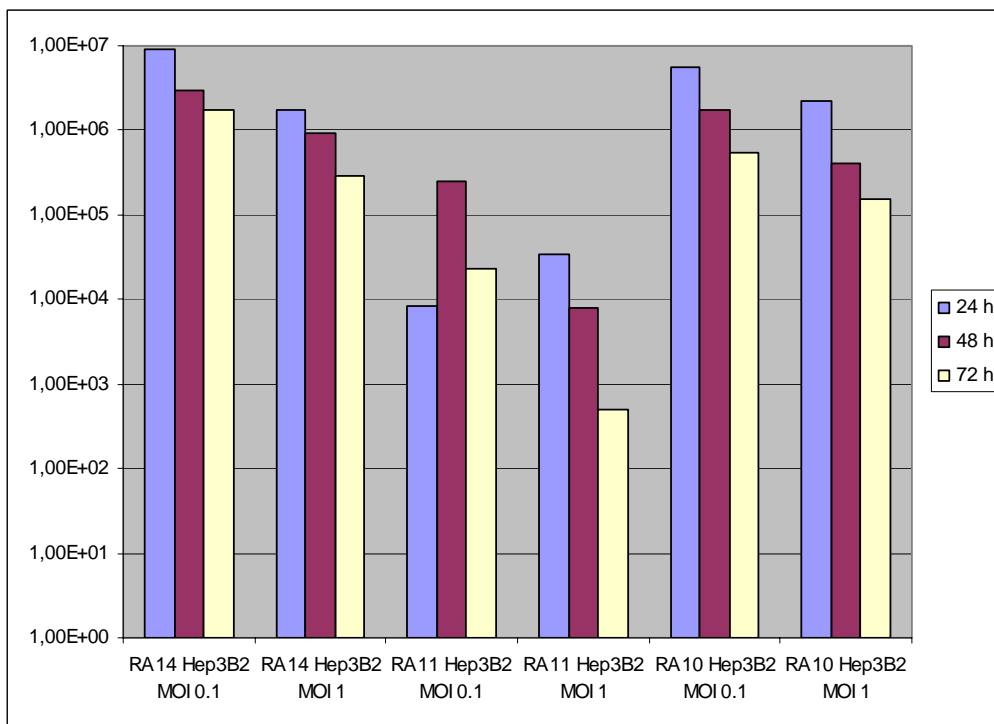
Per analizzare le caratteristiche di crescita dei virus ricombinanti *in vitro*, diverse linee cellulari, (cellule Vero e cellule umane di carcinoma epatico Hep3B2 e HuH-7) sono state infettate ad una molteplicità di infezione (MOI) di 0,1 o di 1 unità formanti placca (pfu)/cellula con i virus H6-HREgD-IGR20:Hluc, H6-EalbPgD-IGR20:Hluc e H6-IGR20:Hluc. Le cellule infettate sono state raccolte a distanza di 24, 48 e 72 ore e successivamente titolate su cellule Hep3B2. I risultati riportati in figura 12 mostrano che i due virus ricombinanti H6-HREgD-IGR20:Hluc, H6-EalbPgD-IGR20:Hluc possiedono un'elevata specificità replicativa per la linea tumorale epatica Hep3B2 dando un titolo virale maggiore rispetto a quello rilevato in cellule Vero, diversamente dal virus parentale che mostra un comportamento pressoché simile in tutte le linee cellulari. Dal controllo dell'infezione nel corso dell'esperimento si è potuto osservare che le cellule Hep3B2 infettate con i virus H6-HREgD-IGR20:Hluc, H6-EalbPgD-IGR20:Hluc giungono ad effetto citopatico pressoché completo già a 24 ore dopo l'infezione anche ad una MOI di 0,1, determinando la diminuzione del titolo virale, anziché l'incremento, a 72 ore in quanto tutte le cellule sono già morte. Inoltre, l'osservazione fenotipica delle placche di lisi ha permesso di osservare che il virus H6-EalbPgD-IGR20:Hluc produce placche piccolissime su cellule Vero e HuH-7 rispetto a quelle prodotte su Hep3B2, effetto osservabile, anche se in maniera meno evidente, anche per il ricombinante H6-HREgD-IGR20:Hluc. Questo dato dimostra la migliore capacità replicativa dei virus ricombinanti su cellule di epatocarcinoma.

Risulta peraltro evidente che i due virus ricombinanti contenenti i promotori specifici HRE ed EalbP non sono in grado di infettare altrettanto bene la linea cellulare di tumore epatico HuH-7. Tale linea cellulare è anche meno sensibile all'infezione da parte del virus parentale H6-IGR20:Hluc con conseguente produzione di una minore progenie virale. Si può osservare che mentre il ricombinante virale H6-EalbPgD-IGR20:Hluc produce una bassissima quantità di progenie virale anche a 72 dopo l'infezione ad un MOI di 1, il ricombinante H6-HREgD-IGR20:Hluc dopo una partenza stentata comincia a replicarsi maggiormente.

A



B



C

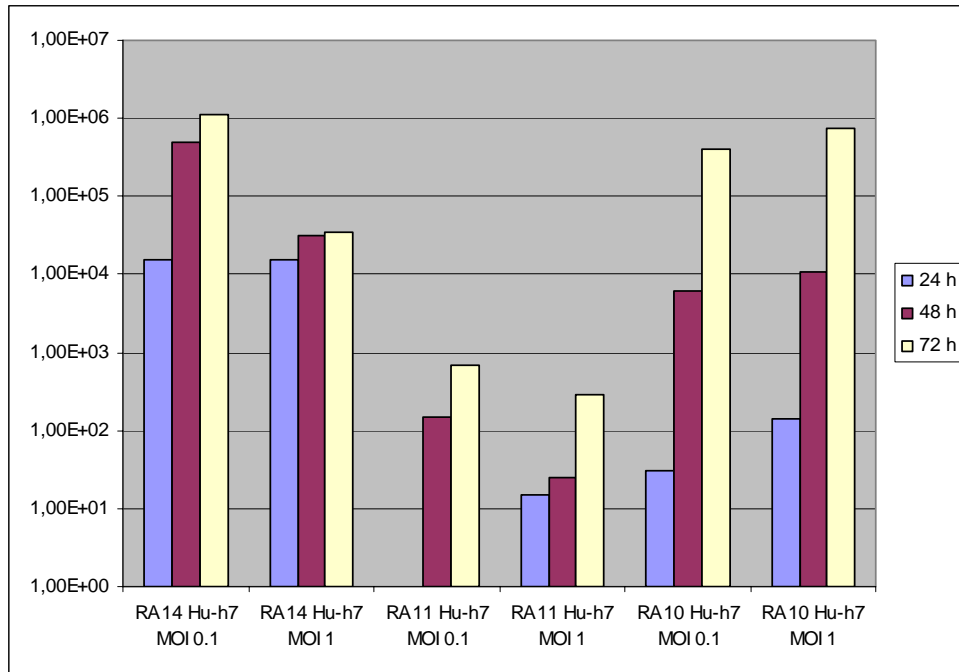


Figura 12. Rappresentazione schematica dell'analisi di crescita dei virus H6-HREgD-IGR20:Hluc (RA10), H6-EalbPgD-IGR20:Hluc (RA11) e H6-IGR20:Hluc (RA14) su cellule Vero (pannello A), Hep3B2 (pannello B) e HuH-7 (pannello C) a 24, 48 e 72 ore dall'infezione a 1 e 0,1 MOI. **Pannello A:** Come si può notare dal grafico i ricombinanti H6-EalbPgD-IGR20:Hluc, contenente il promotore specifico dell'albumina EalbP, possiedono una scarsa capacità replicativa in cellule Vero dando un titolo finale molto più basso rispetto a H6-HREgD-IGR20:Hluc e al virus parentale. **Pannello B:** Tutti e tre i virus mostrano un'alta capacità replicativa in cellule Hep3B2 con titoli virali molto alti già a 24 ore dall'infezione. **Pannello C:** I due virus ricombinanti contenenti i promotori specifici HRE ed EalbP non sono in grado di infettare bene la linea cellulare di tumore epatico HuH-7. Tale linea cellulare è anche meno sensibile all'infezione da parte del virus parentale H6-IGR20:Hluc con conseguente produzione di una minore progenie virale.

Sono attualmente in corso analisi della crescita di tali virus su queste e su altre linee cellulari, sia primarie che tumorali, a diverse MOI e a tempi differenti di infezione.

ESPERIMENTI “IN VIVO”

Per valutare la tossicità, l'espressione dell'attività luciferasica e l'effetto antitumorale dei ricombinanti H6-HREgD-IGR20:Hluc e H6-EalbPgD-IGR20:Hluc, sono stati condotti degli esperimenti *in vivo* nel modello murino presso il laboratorio del dr. Hernandez-Alcoceba all'Università di Navarra, Pamplona.

Tossicità. La tossicità dei vettori è stata testata in un ceppo di topi “nudi” (topi immunodeficienti usati per indurre la crescita di cellule tumorali di alcune specie, compresa quella umana). I vettori sono stati inoculati per via intravenosa per determinare la percentuale di

sopravvivenza dei topi nel tempo. I risultati (riportati in figura 13) hanno mostrato notevoli differenze tra i topi infettati con il controllo positivo rappresentato dal virus parentale H6-IGR20:Hluc e quelli in cui sono stati inoculati i due virus ricombinanti. Essi, infatti, hanno dimostrato una tossicità minima del tutto simile al controllo negativo rappresentato da soluzione salina, al contrario del virus parentale che determina la morte di quasi tutti gli animali a distanza di pochi giorni dall'infezione.

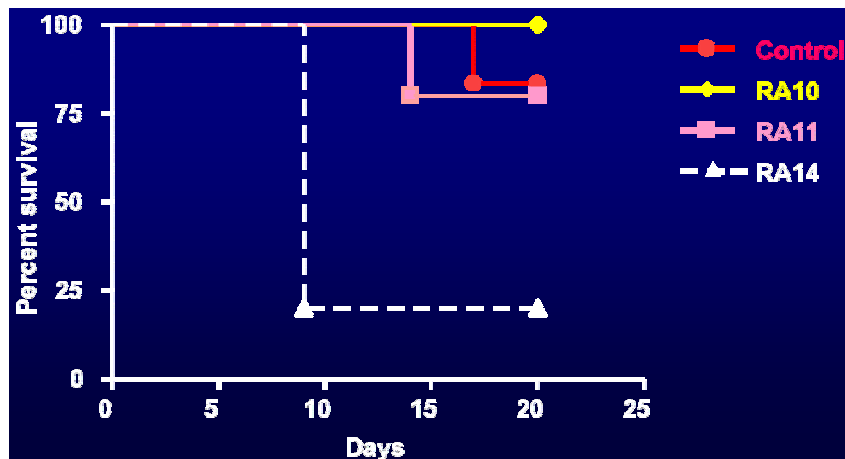


Figura 13. Tossicità dei vettori H6-HREgD-IGR20:Hluc (RA10), H6-EalbPgD-IGR20:Hluc (RA11) e il virus parentale H6-IGR20:Hluc (RA14) in topi nudi. La linea rossa è relativa ai topi di controllo inoculati con soluzione salina. Il virus è stato inoculato per via intravenosa alle dosi indicate in materiali e metodi.

Espressione intratumorale dell'attività luciferasica. L'espressione intratumorale della luciferasi e l'effetto antitumorale dei ricombinanti virali, sono stati determinati in tumori sottocutanei, derivati dall'impianto di 10^7 cellule di epatocarcinoma umano (HuH-7) nel fianco dei topi "nudi". Il monitoraggio dell'attività luciferasica è avvenuto in seguito all'inoculazione intratumorale dei ricombinanti virali e del virus parentale come controllo e, come si può notare nella foto in figura 14 il segnale ha una localizzazione principalmente tumorale per i due virus ricombinanti, mentre sembra diffondersi anche ad altri organi per quanto riguarda il virus parentale. In particolare l'espressione della luciferasi rilevata dal virus parentale è inizialmente molto alta, ma comincia a decrescere in intensità dopo circa 10 giorni dall'inoculo (figura 14, profilo B). Tale calo di intensità si associa ai risultati ottenuti nei successivi esperimenti sull'attività antitumorale, da cui è possibile notare un drastico calo della massa tumorale, ma entrambi i dati ottenuti sono da porre in relazione alla forte tossicità del virus che determina la morte precoce della quasi totalità degli animali utilizzati nell'esperimento. Al contrario,

l'espressione della luciferasi rilevata in seguito all'inoculo intratumorale dei ricombinanti virali H6-HREgD-IGR20:Hluc e H6-EalbPgD-IGR20:Hluc, seppur relativamente bassa a poche ore dall'infezione, si mantiene costante ad alti livelli per diversi giorni.

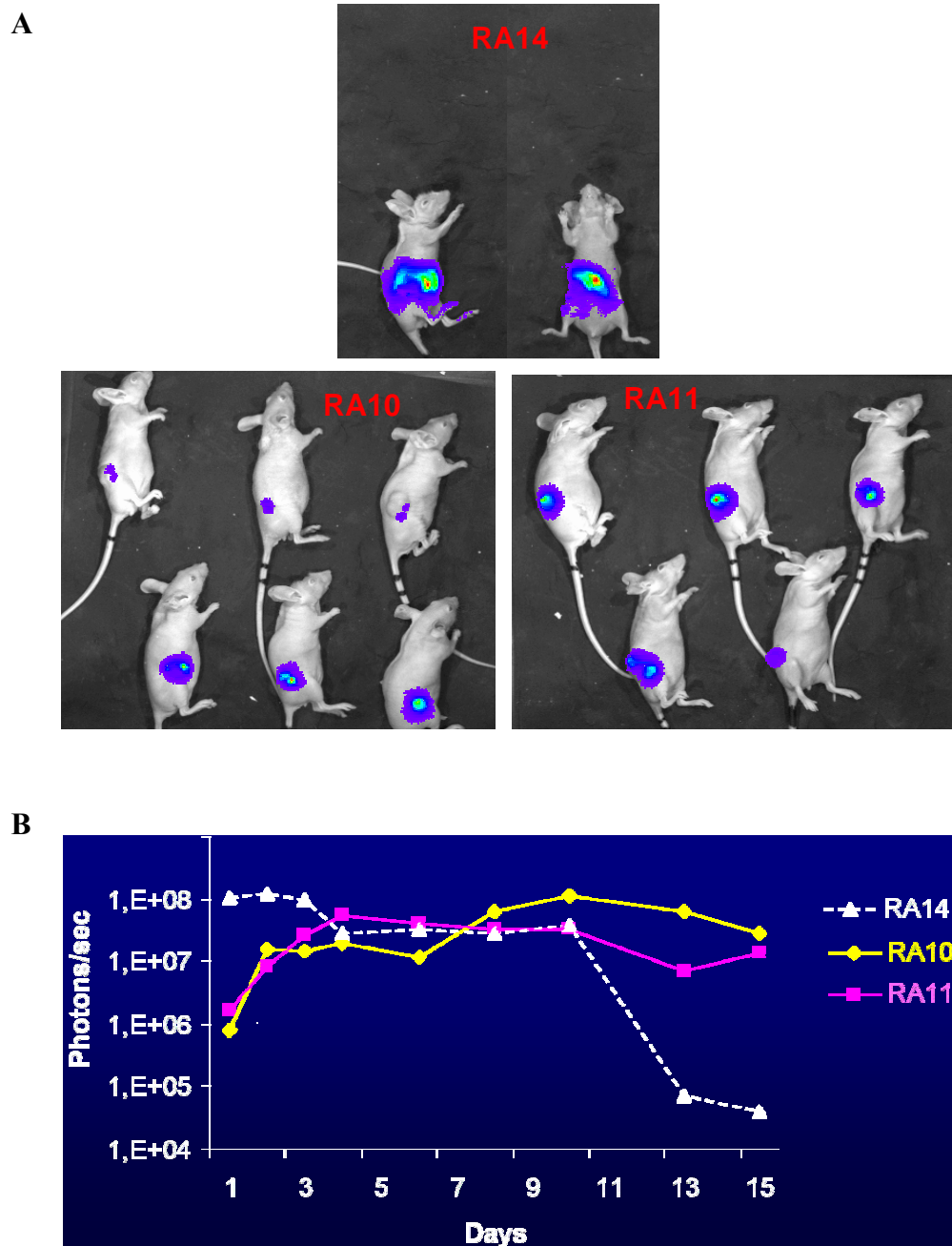


Figura 14. (A) Segnale della luciferasi rilevato nei topi nudi dopo 10 giorni dall'inoculo intratumorale dei vettori H6-HREgD-IGR20:Hluc (RA10), H6-EalbPgD-IGR20:Hluc (RA11) e del virus parentale H6-IGR20:Hluc (RA14). (B): Espressione intratumorale della luciferasi nel corso del tempo L'espressione della luciferasi dopo inoculazione intratumorale, è stata rilevata tramite strumento IVIS (Image Visualization & Infrared Spectroscopy) ed è riportata nell'immagine sopra; il grafico sotto rappresenta la quantità di luciferasi rilevata nel tempo dopo inoculo intratumorale dei vettori.

Effetto antitumorale. Dosi uguali dei ricombinanti virali e del virus parentale utilizzato come controllo sono state iniettate all'interno del tumore, per verificarne l'efficacia antitumorale, misurata in termini di riduzione della massa tumorale, come descritto in materiali e metodi. Le dimensioni della massa tumorale sono state misurate a diversi giorni dopo l'infezione. In figura 15 sono rappresentati i dati relativi ad una singola iniezione intratumorale di vettore.

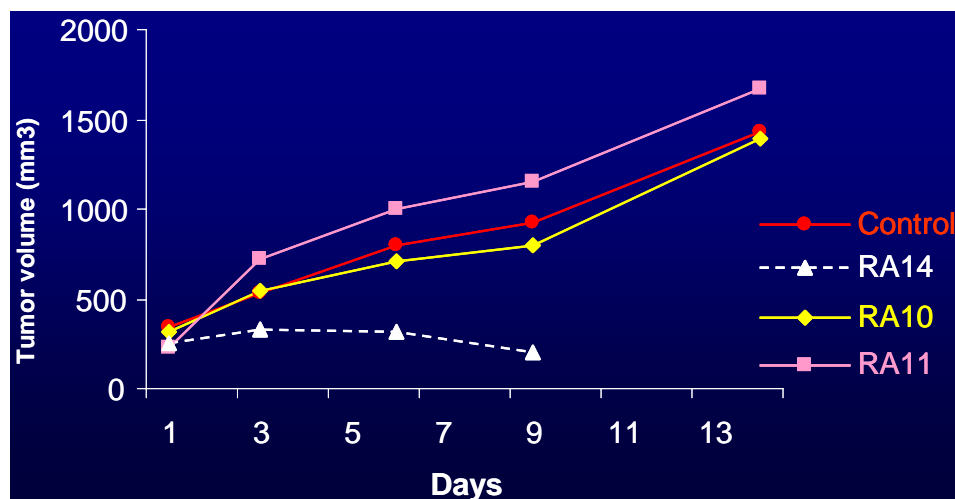


Figura 15. Iniezione intratumorale dei vettori H6-HREgD-IGR20:Hluc (RA10), H6-EalbPgD-IGR20:Hluc (RA11) e il virus parentale H6-IGR20:Hluc (RA14) in topi "nudi". Nel grafico sono riportate le curve di crescita della massa tumorale dopo una singola iniezione intratumorale dei vettori: la curva rossa è relativa ai topi di controllo inoculati con soluzione salina. I virus ricombinanti hanno un andamento simile al controllo, al contrario del virus parentale che determina una drastica riduzione della massa tumorale correlata alla morte degli animali.

La riduzione della massa tumorale è stata analizzata *in vivo* attraverso l'espressione della luciferasi monitorata tramite strumento IVIS (Image Visualization & Infrared Spectroscopy), lo stesso utilizzato per gli esperimenti di monitoraggio dell'attività luciferasica, che permette di analizzare l'espressione della luciferasi nel topo sottoposto ad anestesia. I risultati non evidenziano una sostanziale riduzione della massa tumorale in seguito all'inoculazione dei ricombinanti H6-HREgD-IGR20:Hluc e H6-EalbPgD-IGR20:Hluc che invece mostrano un comportamento del tutto simile al controllo negativo rappresentato dalla sola soluzione salina. Una riduzione della massa tumorale si ottiene invece con il virus parentale H6-IGR20:Hluc ma, come mostrato in precedenza, tale risultato è dovuto essenzialmente alla forte tossicità che porta alla morte dell'animale nel giro di pochi giorni.

Considerati nel loro insieme, i dati sopra ottenuti ci hanno permesso di dimostrare che la sostituzione del promotore virale che guida l'espressione della glicoproteina essenziale D con due promotori differenti, uno fegato-specifico (EalbP) ed uno tumore-specifico (HRE) induce l'attenuazione del virus parentale e determina una minore tossicità *in vivo*. Il fatto che i

ricombinanti virali H6-HREgD-IGR20:Hluc e H6-EalbPgD-IGR20:Hluc non provochino un decremento della massa tumorale è in accordo con i dati ottenuti *in vitro* sulla linea cellulare HuH-7, dove è stato dimostrato che questi virus non sono in grado di crescere bene.

Sono attualmente in corso esperimenti di biodistribuzione dei ricombinanti virali in altri organi nel corso del tempo e test dose-effetto volti a valutare se una diversa concentrazione dei virus inoculati nella massa tumorale possa indurre un decremento mantenendo bassi i valori di tossicità. Inoltre stiamo valutando la messa a punto di un differente modello tumorale basato su cellule che siano suscettibili all'infezione da parte di tale ceppo virale.

Contemporaneamente, stiamo progettando la costruzione di altri mutanti virali che ospitino le mutazioni sopra riportate insieme alla presenza, in un'altra regione intergenica del genoma di VHS-1, di geni codificanti per uno o più fattori immunostimolanti che siano in grado di stimolare una risposta immunitaria specifica anti-tumorale.

COSTRUZIONE DI VHS ONCOLITICI MODIFICATI NEL *TARGETING* RECETTORIALE

Le glicoproteine di VHS che mediano l'entrata e l'attacco del virus alla cellula ed i loro meccanismi di interazione sono abbastanza conosciuti. VHS entra nella cellula attraverso un meccanismo di fusione che coinvolge tre glicoproteine: la gB e l'eterodimero gH/gL. L'attacco è invece mediato dalle glicoproteine gB, gC e gD. La gC e la gB interagiscono con un primo recettore costituito dall'eparansolfato (HS), mentre la gD è in grado di legare tre recettori alternativi: HveA o HVEM, HveC o nectin 1 e residui 3-OS presenti su l'HS. I primi due recettori sono presenti nella maggior parte dei tessuti, comprese le cellule del tessuto nervoso, mentre la presenza di 3-OS sembra importante solo nel tessuto della cornea. Strutturalmente l'ectodominio della gD ha una struttura centrale "core" di tipo immunoglobulinico (aa 56-184) racchiuso da estensioni COOH e NH₂ terminali. L'analisi co-cristallografica della gD e di HVEM ha stabilito che il loro sito di interazione mappa nella sequenza N-terminale (aa 7-32). Il sito di legame della gD con nectin 1 è invece discontinuo e richiede alcune sequenze comprese fra gli aa 32-250. La capacità della gB e gD di accettare sequenze estranee e di ri-direzionare il tropismo virale verso recettori eterologhi è di fondamentale importanza, anche se particolarmente difficile, nella costruzione di VHS oncolitici. Infatti, la gD e la gB sono due proteine essenziali per l'infettività virale e qualsiasi cambiamento nella loro sequenza aminoacidica (inserzioni e/o delezioni) può portare alla perdita dell'attività biologica di queste componenti. Ad esempio, se si vogliono inserire nuovi ligandi in gD, per favorire il

riconoscimento di recettori presenti su cellule e/o tessuti specifici, è importante non alterare le sequenze che portano all'interazione di gD con il complesso gB, gH/gL, alla sua attivazione ed alla successiva entrata del virus nella cellula per fusione fra il pericapside e la membrana cellulare.

Uno degli scopi della nostra ricerca è quello di costruire virus ricombinanti oncolitici con un *targeting* recettoriale specifico per il tessuto epatico che in seguito possa essere associato ad un *targeting* trascrizionale specifico per l'epatocarcinoma. Per costruire VHS ricombinanti con un *targeting* recettoriale specifico per la cellula epatica è necessario modificare le glicoproteine virali presenti sul pericapside virale coinvolte nei processi di attacco e penetrazione nella cellula, in particolare gB, gD e gC. A tale proposito si è deciso di utilizzare il virus ricombinante KgBpK⁻gC:PreS1ap, precedentemente costruito nel nostro laboratorio, dove le sequenze di legame di gC e gB a HS sono state delete o sostituite con un peptide di 25 aminoacidi (PreS1ap), presente nella regione preS1 di HBV, che è stato dimostrato legarsi a recettori presenti sugli epatociti. Studi condotti sul virus KgBpK⁻gC:PreS1ap hanno dimostrato che questo virus si lega preferenzialmente agli epatociti pur mantenendo il tropismo per altre linee cellulari, dovuto alla presenza del secondo recettore riconosciuto dalla gD. Per rendere maggiormente selettivo o esclusivo il legame di KgBpK⁻gC:PreS1ap con il recettore epatico ci siamo proposti di modificare la gD, dove le sequenze di legame con HveA e HveC sono delete o sostituite con il peptide preS1ap.

A) Costruzione del plasmide codificante la proteina di fusione gD-PreSap

Recenti studi biochimici e strutturali hanno dimostrato che i siti di *binding* di gD con il recettore cellulare HVEM e nectina risiedono a livello dei primi 34 aminoacidi (aa) della parte amino-terminale distanti dai siti responsabili dell'attivazione del meccanismo di fusione tra pericapside virale e membrana cellulare. Si è quindi deciso di utilizzare come costrutto di base per la costruzione del gene di fusione gD-PreS1ap, la mutazione messa a punto dal gruppo di ricerca del Prof. B. Roizman per la costruzione del mutante R5141 contenente la molecola di fusione gD-IL13, che prevede la delezione dei primi 34 aa di gD sostituiti dalla sequenza codificante l'interleuchina 13 (IL13) e l'inserimento di una mutazione puntiforme a livello dell'aa 35 che da Valina è convertito a Serina. Fra i vari costrutti presi in considerazione, infatti, questo più di ogni altro portava alla completa eliminazione dei siti di *binding* di gD con i suoi recettori e conferiva al ricombinante virale un'elevata capacità di legame al recettore per l'interleuchina 13 mantenendo inalterata l'interazione della gD con il complesso fusogeno costituito da gB e l'eterodimero gH-gL.

Per la costruzione della molecola di fusione gD-PreS1ap la sequenza compresa tra l'aa 24 e l'aa 34 verrà deleta e sostituita da quella codificante il peptide PreS1ap e la tripletta codificante l'aa 35 (Valina) verrà trasformata per ottenere l'aa Serina. I primi 24 aa sono così mantenuti poiché studi di letteratura hanno confermato che essi codificano per il peptide segnale di gD, responsabile della traslocazione della glicoproteina neoformata sulla superficie della membrana pericapsidica.

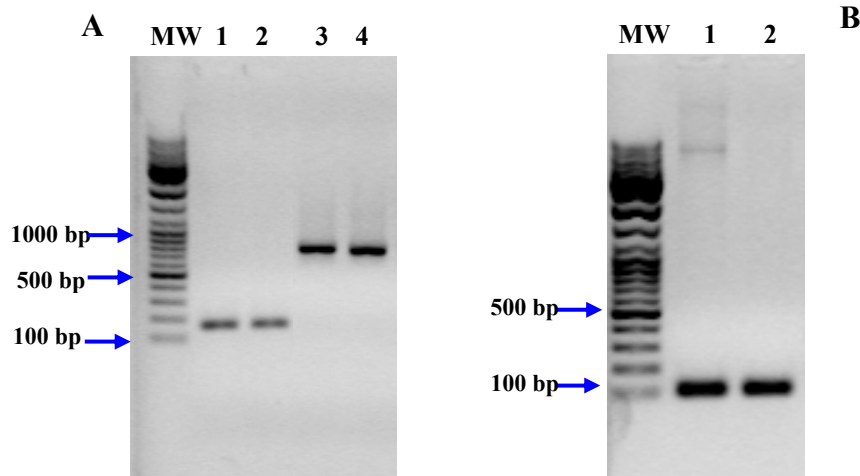


Figura 16. Analisi mediante elettroforesi su gel di agarosio dei frammenti amplificati per PCR e purificati. **Pannello A:** Il frammento a monte della sequenza di gD di 156 bp è stato amplificato per PCR utilizzando due oligonucleotidi in grado di inserire la sequenza di riconoscimento per l'endonucleasi di restrizione *XbaI* all'estremità 3' (**1 e 2**). Il secondo frammento di 741 bp è stato amplificato utilizzando due oligonucleotidi in grado di inserire la sequenza di riconoscimento per *XbaI* all'estremità 5' del frammento (**3 e 4**). **Pannello B:** il frammento di 81 bp codificante il peptide attivo PreS1ap è stato amplificato per PCR utilizzando due oligonucleotidi in grado di inserire le sequenze di riconoscimento per l'endonucleasi di restrizione *XbaI* ad entrambe le estremità 5' e 3' (**1 e 2**).

Per sostituire i 10 aa di gD con il peptide PreS1ap e introdurre una mutazione puntiforme a livello dell'aa 35 si sono creati due amplificati per PCR. Il primo di 156 bp, compreso tra il sito *HindIII*(138344 bp) a monte della sequenza codificante gD all'estremità 5', e l'aa 24, è stato amplificato per PCR utilizzando due oligonucleotidi in grado di inserire la sequenza di riconoscimento per l'endonucleasi di restrizione *XbaI* all'estremità 3'; il secondo di 741 bp, compreso tra l'aa 35 all'estremità 5' e il sito *XagI* (139328 bp) all'estremità 3', è stato amplificato utilizzando due oligonucleotidi in grado di inserire la sequenza di riconoscimento per *XbaI* all'estremità 5' del frammento (figura 16; pannello A) e più precisamente a livello dell'aa 35 (138593 bp). I due amplificati sono stati poi digeriti rispettivamente con *HindIII-XbaI* e *XbaI-XagI* e inseriti nei corrispondenti siti del plasmide pTZ18U-BamJgD* (*HindIII*-138344 bp; *XagI*-139328 bp) precedentemente modificato mediante l'eliminazione del sito *XbaI* (282 bp). In tal modo si è creata una delezione di 10 aa corrispondenti ai siti di legame con il recettore HVEM

e nectina e l'inserimento del sito *XbaI* a livello dell'aa 35 ha avuto il doppio scopo di facilitare il successivo inserimento del peptide PreS1ap e di creare allo stesso tempo una mutazione nella tripletta codificante la Valina che in tal modo è convertita in Serina. Le 81 paia di basi codificanti PreS1ap, sono state amplificate per PCR utilizzando due oligonucleotidi in grado di inserire le sequenze di riconoscimento per l'endonucleasi di restrizione *XbaI* ad entrambe le estremità 5' e 3' (figura 16; pannello B).

L'amplificato è stato poi digerito con *XbaI* e clonato nel corrispondente sito del plasmide pTZ18U-BamJgD* (*XbaI*-138593 bp) creando così il plasmide pTZ18U-BamJgD*-PreS1ap (figura 17).

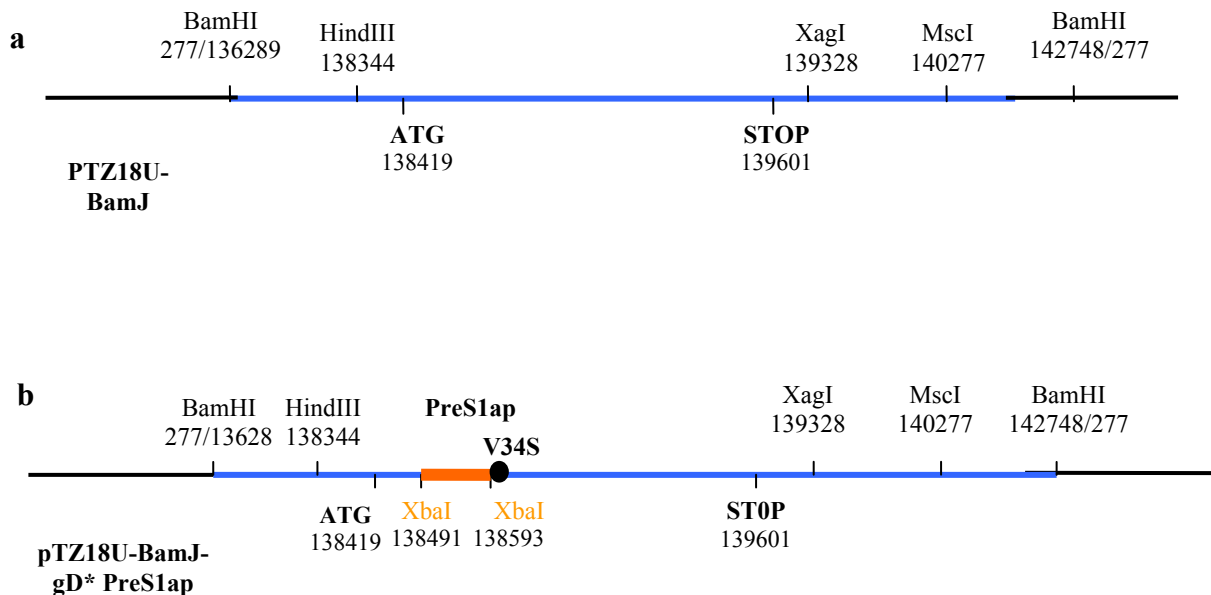


Figura 17. Struttura della molecola di fusione gD:PreSap. (a) Struttura del plasmide pTZ18U-BamJ in cui è stata clonata la regione *BamHI* che contiene la sequenza codificante la gD *wt* del ceppo KOS di VHS-1. (b) la molecola di fusione gD:PreSap è stata creata inserendo la sequenza codificante il peptide attivo PreS1 (PreSap) *in frame* all'interno della sequenza codificante gD nelle posizioni 138491-138593, sostituendo gli aa 24-34

B) Costruzione del virus ricombinante KgBpK⁻gC:PreS1apgD:PreS1ap

Il plasmide pTZ18U-BamJgD*PreS1ap è stato utilizzato per co-transfettare cellule Vero, Vero-gD e Hep3B2 con il DNA virale KgBpK⁻gC:PreS1apΔgD:EGFP nel quale era stata precedentemente deleta una porzione del gene US6 codificante la gD sostituita da un marcatore fenotipico, EGFP (figura 17). Oltre alla presenza del marcatore fenotipico a placche “bianche”, la crescita dei ricombinanti H6-HREgD e H6-EalbP-gD solamente su cellule di carcinoma

epatico (Hep3B2) oltre che nella linea complementante Vero-gD esprimente gD ne faciliterà la purificazione.

Attualmente si sta terminando il primo ciclo di *limiting dilution* per l'isolamento del ricombinante KgBpK⁻gC:PreS1apgD:PreS1ap.

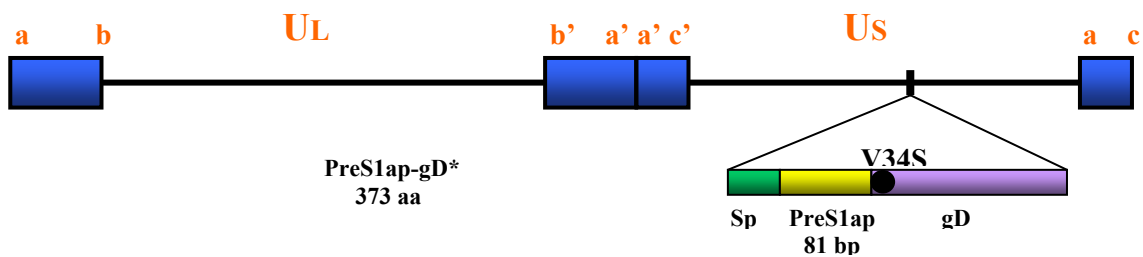


Figura 17. Rappresentazione schematica della ricombinazione omologa per la costruzione del virus ricombinante KgBpK⁻gC:PreS1apgD:PreS1ap.

Nel frattempo, con le metodiche descritte in precedenza, il gene *reporter* per la luciferasi è stato inserito nella IGR20 del virus KgBpK⁻gC:PreS1ap ottenendo il ricombinante KgBpK⁻gC:PreS1ap-IGR20:Hluc. Tale virus è stato recentemente inviato presso il laboratorio del dr. Hernandez-Alcoceba all'Università di Navarra, a Pamplona, dove è attualmente utilizzato per studi di biodistribuzione *in vivo*. I risultati ottenuti saranno utili per capire se il *targeting* recettoriale, anche solo parziale, per gli epatociti possa migliorare le caratteristiche di biodistribuzione del virus rendendolo più selettivo per il tessuto epatico.

DISCUSSIONE

Dati derivati da studi epidemiologici indicano che circa l'80% dei tumori epatici primari è rappresentato dal carcinoma epatocellulare (HCC), che risulta inoltre essere uno dei tumori maligni prevalenti nel mondo specialmente in Asia e in Africa con un'incidenza annua di quasi 1 milione di casi. Il fegato è anche l'organo in cui si verificano più frequentemente metastasi dovute soprattutto a tumori gastrointestinali come il tumore colon-rettale. La rimozione chirurgica del tumore pur rappresentando la terapia di scelta, nella maggioranza dei casi non viene praticata a causa della presenza concomitante di cirrosi epatica dovuta solitamente a infezioni croniche del virus dell'epatite B e C. Altre opzioni terapeutiche sono rappresentate dal trapianto di fegato, chemio e radioterapia, iniezioni percutanee di etanolo ed embolizzazione transarteriale⁸⁷. Nonostante lo sviluppo di nuovi trattamenti terapeutici, la prognosi per l'HCC avanzato rimane comunque molto bassa con una aspettativa di vita di circa 6 mesi dal momento della diagnosi. In tale contesto diventa necessario lo sviluppo di nuove strategie terapeutiche. La terapia genica è una disciplina sperimentale in continua evoluzione che offre interessanti opportunità per il trattamento del tumore epatico, in particolare lo sviluppo di vettori virali oncolitici naturali o ingegnerizzati rappresenta un promettente strumento terapeutico da associare, come adiuvante, alle terapie convenzionali.

Alcuni virus, come ad esempio il virus della stomatite vescicolare (VSV), hanno la proprietà intrinseca di replicarsi solamente in cellule cancerose lasciando relativamente intatti i tessuti sani circostanti. Altri virus possono essere invece modificati geneticamente per rendere la loro replicazione tumore-specifica.

Tra i virus oncolitici maggiormente utilizzati per la cura dell'HCC sono compresi i vettori derivanti dall'Adenovirus, la maggior parte dei quali presenta delezioni che coinvolgono i geni precoci E1 (E1A o E1B) acquisendo così la capacità di replicarsi in modo specifico nelle sole cellule tumorali. Altri vettori adenovirali, attualmente in fase di studio sull'uomo, presentano delezioni in geni differenti come ad esempio il gene E3 o E4 e l'inserimento di promotori tumore- o tessuto-specifici a monte dei geni E1A e/o E1B allo scopo di limitare ulteriormente la replicazione ai soli tessuti tumorali. Tuttavia l'effetto antitumorale di tali vettori risulta spesso troppo modesto e la mancanza di un meccanismo di inattivazione in grado di bloccare in qualsiasi momento la diffusione del virus, aumenta i rischi legati a una possibile reversione del virus al fenotipo *wild type* (*wt*).

Un altro virus di rilevante importanza nel campo della viroterapia dei tumori è il virus dell'Herpes simplex di tipo 1 (VHS-1). Sono numerose le caratteristiche che rendono VHS-1 un buon candidato come vettore per la terapia genica contro il cancro, ed in particolare: (1) la sua capacità di infettare differenti tipi di cellule, sia in attiva divisione che quiescenti; (2) la presenza

di un DNA virale di 152 Kb che può essere modificato in modo da contenere circa 50 Kb di segmenti eterologhi in regioni diverse del genoma, permettendo l'espressione simultanea di proteine terapeutiche veicolate da un unico vettore; (3) un genoma che rimane libero, allo stato episomiale e che non si integra nel DNA cellulare, al contrario di vettori derivati da retrovirus e virus adenoassociati; (4) la possibilità di poter bloccare la replicazione virale con farmaci come Ganciclovir o Aciclovir, dovuta alla presenza nel genoma virale del gene della timidina chinasi (TK). Attualmente diversi vettori erpetici sono in fase di studio in diversi *trials* clinici per la cura di tumori del sistema nervoso centrale come i glioblastomi. In particolare il mutante G207, testato in pazienti che avevano subito in precedenza la resezione chirurgica di gliomi maligni, è tra i pochi vettori oncolitici ad essersi dimostrato efficace e soprattutto privo di tossicità.

Inoltre, di particolare importanza, si è osservato che la somministrazione intraportale di vettori erpetici oncolitici (hrR3, G207, Myb34.4)⁸⁸ rappresenta un efficace trattamento per le metastasi epatiche, dovute al carcinoma colon-rettale, nel modello sperimentale murino.

Risulta chiaro però che per limitare il più possibile il danno ai tessuti sani e per creare vettori sicuri che possano essere somministrati anche per via intravenosa è necessario far acquisire al virus una specifica combinazione di *targeting* sia a livello dell'ingresso del virus nella cellula sia a livello dell'espressione genica e della replicazione.

In tale ambito, il nostro gruppo di ricerca si occupa dello sviluppo di vettori erpetici innovativi per la cura del carcinoma epatocellulare (HCC). L'innovazione di tali vettori risiede nel fatto che essi non contengono alcuna delezione in geni virali, la cui mancanza potrebbe limitare la capacità oncolitica del virus, mentre determinati geni essenziali per la replicazione virale vengono posti sotto il controllo trascrizionale di promotori sia fegato-specifici che tumore-specifici attivando l'oncolisi virale solo nel tessuto bersaglio.

In particolare gli esperimenti condotti in questo studio sono stati volti alla costruzione dei mutanti virali H6-HREgD e H6-EalbPgD nei quali il promotore del gene codificante la gD, glicoproteina essenziale per la replicazione virale, è stato deletato e sostituito o con il promotore tumore-specifico HRE (*Hypoxia Response Element*), attivato solo nello stato di ipossia, condizione che generalmente si verifica nella porzione solida della massa tumorale, o con il promotore fegato-specifico del gene per l'albumina (EalbP-a1AT), proteina altamente espressa nelle cellule epatiche. Tali ricombinanti sono stati costruiti a partire da un mutante sinciziale derivato dal ceppo HVEM di VHS-1, chiamato H6. La scelta di utilizzare un virus dal fenotipo sinciziale è stata motivata dal fatto che studi recenti hanno dimostrato che l'attività fusogena conferisce al virus una maggiore capacità oncolitica e ne limita anche il riconoscimento da parte del sistema immunitario.

Per poter analizzare la capacità di crescita dei due virus ricombinanti sia *in vitro*, utilizzando diverse linee cellulari, sia *in vivo*, valutandone la tossicità e l'efficacia oncolitica nel modello murino, cassette di espressione contenenti i geni reporter EGFP e luciferasi, sono state clonate nella regione intergenica IGR20. Questa regione è rappresentata da una sequenza non codificante di circa 600 bp compresa tra il gene UL26.5 e il gene UL27, in modo tale da non interrompere nessun gene virale, e quindi non alterare troppo la virulenza e la tossicità per le cellule bersaglio. Si sono così ottenuti i ricombinanti virali H6-HREgD-IGR20:EGFP e H6-EalbPgD-IGR20:EGFP che esprimono la EGFP e H6-HREgD-IGR20:Hluc e H6-EalbgD-IGR20:Hluc, che esprimono la luciferasi.

Una volta purificati e analizzati mediante *Southern Blot* i ricombinanti e il virus parentale contenenti la cassetta di espressione del gene luciferasi, sono stati inviati al laboratorio del dr. Hernandez-Alcoceba presso l'Università di Navarra, a Pamplona per i successivi test *in vivo*.

Contemporaneamente nel nostro laboratorio sono stati effettuati gli esperimenti di crescita *in vitro* di tali ricombinanti utilizzando differenti linee cellulari, in particolare cellule Vero e cellule umane di carcinoma epatico Hep3B2 e HuH-7. Dai risultati si è potuto riscontrare che, al contrario del virus parentale H6-IGR20:Hluc, i due virus ricombinanti possiedono un'elevata specificità replicativa per la linea tumorale epatica Hep3B2, dando un titolo virale maggiore rispetto a quello rilevato in cellule Vero, in cui è possibile notare anche un cambiamento fenotipico delle placche di lisi che risultano piccolissime rispetto a quelle presenti sulle cellule Hep3B2. Questo dato dimostra la migliore capacità replicativa dei virus ricombinanti su cellule di epatocarcinoma. Si è tuttavia riscontrato che i virus ricombinanti non sono in grado di infettare altrettanto bene la linea cellulare di tumore epatico HuH-7. Ciò è probabilmente da imputare a una bassa suscettibilità da parte di tale linea cellulare all'infezione da parte di VHS-1. Anche per tale motivo sono attualmente in corso analisi della crescita di tali virus su queste e su altre linee cellulari, sia primarie che tumorali, a diverse MOI e a tempi differenti di infezione.

Per quanto riguarda i test *in vivo*, i ricombinanti H6-HREgD-IGR20:Hluc e H6-EalbgD-IGR20:Hluc e il virus parentale H6-IGR20:Hluc, sono stati sottoposti a test di tossicità, di biodistribuzione e di attività antitumorale. La tossicità, determinata nel modello sperimentale murino in seguito all'inoculazione dei virus per via intravenosa, si è dimostrata minima per i due vettori ricombinanti, mentre è risultata elevata in seguito all'inoculazione con il virus parentale, con un tasso di mortalità di circa l'85%. La biodistribuzione virale, in seguito ad inoculazione intratumorale, è stata valutata analizzando l'espressione dell'attività luciferasica e come si può notare ha una localizzazione prevalentemente tumorale, mentre sembra diffondersi ad altri organi per quanto riguarda il ceppo parentale. È anche importante notare che l'espressione della

luciferasi è ugualmente elevata, a tre giorni dall'inoculazione, sia nel virus parentale che nei due ricombinanti. In questi ultimi si mantiene a livelli elevati fino al quindicesimo giorno, ma non è associata ad una riduzione del tumore. Il virus parentale mostra invece una drastica diminuzione dell'attività luciferasica, derivata dalla lisi tumorale, ma comunque associata ad un'elevata mortalità. La scarsa attività antitumorale dei virus ricombinanti può essere dovuta al fatto che, come evidenziato dai test di crescita in varie linee cellulari, le cellule HuH-7 vengono infettate con molta difficoltà dando un titolo finale molto basso. Per avere dei dati più certi e precisi sono quindi necessari altri esperimenti da effettuare con dosi scalari di virus sia su tumori derivati da cellule HuH-7, che da altre linee cellulari di epatocarcinoma come le Hep3B2 e le HepG2⁸⁹.

I dati ottenuti dagli esperimenti *in vitro* e *in vivo* hanno dimostrato che i ricombinanti virali H6-HREgD-IGR20:Hluc e H6-EalbgD-IGR20:Hluc possiedono un'alta capacità replicativa in alcune linee cellulari di carcinoma epatico (Hep3B2), presentano una tossicità minima nei confronti dell'animale e sono in grado di esprimere un gene *reporter* (luciferasi) in modo costante nel tempo. Tuttavia essi non possiedono ancora un'attività oncolitica sufficiente a debellare o limitare la crescita del tumore nel modello sperimentale *in vivo* da noi utilizzato.

Per tale motivo l'obiettivo successivo a tale tesi sarà quello di inserire in altre regioni intergeniche del genoma dei virus ricombinanti elementi che aumentino l'attività antitumorale come ad esempio geni codificanti fattori antiangiogenici per limitare l'irrorazione di sangue al tessuto tumorale o geni codificanti fattori citotossici come le interleuchine o interferoni in grado di aumentare la risposta immune verso il tumore.

Inoltre poiché studi di letteratura riportano che le terapie virali oncolitiche risultano in genere più efficaci quando associate alla chemio e alla radioterapia e in particolare quest'ultima sembra rafforzare la capacità oncolitica dei virus ricombinanti⁹⁰, ci proponiamo: (i) di associare nel modello murino il trattamento con i virus ricombinanti alle terapie convenzionali; (ii) di porre geni essenziali per la replicazione virale sotto il controllo trascrizionale di promotori responsivi alla radioterapia; (iii) utilizzare sostanze antitumorali come la ciclofosfamide che diminuiscono l'immunità innata antivirale favorendo in tal modo la diffusione del virus nell'area tumorale.

Nella seconda fase del nostro studio ci siamo invece focalizzati sulla costruzione di VHS oncolitici modificati nel *targeting* recettoriale. Per poter re-direzionare il legame di VHS verso un differente recettore cellulare, in modo tale da fargli acquisire oltre ad un *targeting* trascrizionale anche un *targeting* recettoriale specifico per gli epatociti, occorre modificare le glicoproteine coinvolte nei processi di assorbimento e penetrazione di VHS-1 all'interno della cellula. Questo obiettivo è stato già parzialmente raggiunto nel nostro laboratorio tramite la

costruzione del mutante virale KgBpK`gC:PreS1ap delecto nei domini di legame con il recettore cellulare dell'eparansolfato (HS) ed in grado di legarsi specificamente agli epatociti mediante il peptide PreS1ap del virus dell'Epatite B (HBV), responsabile del legame di tale virus agli epatociti. Nonostante ciò questo ricombinante virale rimane ancora infettivo per altri tipi cellulari per la presenza di gD coinvolta sia nell'assorbimento che nella penetrazione del virus nella cellula.

A tale proposito si è costruita una molecola di fusione in cui le sequenze codificanti i siti di *binding* della gD ai propri recettori cellulari sono sostituite in *frame* da quella codificante parte della proteina S (PreSap) e in seguito a ricombinazione omologa si è ottenuto il mutante virale KgBpK`gC:PreS1apgDPreSap, in grado di esprimere ed incorporare nel pericapside la proteina di fusione gDPreSap, che è attualmente in fase di purificazione.

L'obiettivo successivo a tale tesi sarà poi quello di inserire in un unico mutante tutte le modificazioni di *targeting* sia recettoriale che di replicazione, in modo da ottenere un virus ricombinante in grado di entrare e replicarsi effettivamente solo in cellule tumorali epatiche.

La possibilità di avere un virus oncolitico altamente tossico per le cellule tumorali, in grado di aumentare la risposta immune verso il tumore e il cui *targeting* recettoriale e di replicazione sia effettivamente tumore e tessuto specifico, probabilmente avrà un grosso impatto come terapia adiuvante da applicare in combinazione con le terapie convenzionali perché risulta ormai chiaro che solo un approccio coordinato di terapie diverse potrà portare alla completa eradicazione del tumore.

BIBLIOGRAFIA

1. Murray PR, Rosenthal KS, Kobayashi GS, Pfaller MA. "Microbiologia". 2002 EdiSES: Napoli.
2. La Placa "Principi di Microbiologia Medica", 2001 Nona Edizione; Società Editrice Esculapio, Bologna.
3. Dianzani F., Antonelli G., Capobianchi M.R., Dolei A., "Manuale di Virologia Medica". 1997
4. Roizman B, Sears AE. Herpes simplex viruses and their replication. In: Fields BN, Knipe DM, Howley PM, al e (eds). *Fields Virology*. 1996 Lippincott-Raven Publishers: Philadelphia, pp. 2231-2295
5. Spear P.G. Entry of α herpesviruses into cells. *Semin Virol*. 1993 4:167-180.
6. Batterson W., Roizman B. Characterization of the Herpes Simplex virion-associated factor responsible for the induction of α genes. *J. Virol*. 1983; 46: 371-377.
7. Kwong AD., Frenkel N. The HSV virion host shut-off function *J. Virol*. 1989, 63:912-921
8. Laquerre S *et al*. Heparan sulphate proteoglycan binding by herpes simplex virus type 1 glycoproteins B and C, which differ in their contributions to virus attachment, penetration, and cell-to-cell spread. *J. Virol* 1998; 72: 6119-6130
9. Shukla D *et al*. A novel role for 3-O-sulfated heparin sulphate in herpes simplex virus 1 entry. *Cell* 1999; 99: 13-22
10. Campadelli-Fiume G. *et al* The multipartite system that mediates entry of herpes simplex virus into the cell. *Rev. Med. Virol* 2007; 17: 313-326
11. Ogita H, Takai Y. Nectins and nectin-like molecules: roles in cell adhesion, polarization, movement, and proliferation. *IUBMB Life* 2006 ; 58: 334-343
12. Menotti L. Cerretani A, Campadelli-Fiume G. A Herpes simplex recombinant that exhibits a single-chain antibody to HER2/neu enters cells the mammary tumor receptor, independently of the gD receptor. *J. Virol* 2006; 80: 5531-5539
13. Campadelli-Fiume G, Gianni T. HSV glycoproteins and their roles in virus entry and egress. In *Alpha Herpesvirus Molecular and Cellular Biology* 2006, Sandri-Goldin RM (ed.). Caister Academic Press: Norfolk, UK; 135-156
14. Cervantes-Garcia D. *et al*. Oncolytic virotherapy. *Annals of Hepatology* 2008; 7(1): 34-45
15. Everts B. van der Poel HG. Replication-selective oncolytic viruses in the treatment of cancer. *Cancer Gene Ther* 2005; 12(2): 141-161
16. Epstein A. L. *et al*. Recombinant and Amplicon Vectors for Gene Therapy. *Gene Ther* 2005; 5: 445-458

17. Argnani R. *et al.* Replication-competent herpes simplex vectors: design and applications. *Gene Ther* 2005; 12: 170-177
18. Todo T. Oncolytic virus therapy using genetically engineered herpes simplex viruses. *Hum cell* 2002; 15: 151-159
19. Hu JC, Coffin RS. Oncolytic herpes simplex virus for tumor therapy. *Int Rev Neurobiol* 2003; 55 165-184
20. Chiocca EA. Oncolytic viruses. *Nat Rev Cancer* 2002; 2: 938-950
21. Mullen JT, Tanabe KK. Viral oncolysis. *Oncologist* 2002; 7: 106-119
22. Shah AC, Benos D, Gillespie GY, Markert JM. Oncolytic viruses: clinical applications as vectors for treatment of malignant gliomas. *J Neurooncol* 2003; 65: 203-226
23. Post DE, Fulci G, Chiocca EA, Van Meir EG. Replicative oncolytic herpes simplex viruses in combination cancer therapies. *Curr Gene Ther* 2004; 4: 41-51
24. Galanis E, Vile R, Russel SJ. Delivery systems intended for *in vivo* gene therapy of cancer: targeting and replication competent viral vectors. *Crit Rev Oncol Hematol* 2001; 38: 177-192
25. Markert JM, Parker JN, Gillespie GY, Whitley RJ. Genetically engineered human herpes simplex virus in the treatment of brain tumours. *Herpes* 2001; 8: 17-22
26. Toda M, Rabkin SD, Kojima H, Martuza RL. Herpes simplex anti-tumor immunity. *Hum Gene Ther* 1999; 10: 385-393
27. Toda M, Martuza RL, Rabkin SD. Tumor growth inhibition by intratumoral inoculation of defective herpes simplex virus vectors expressing granulocyte-macrophage colony-stimulating factor. *Mol Ther* 2000; 2: 324-329
28. Cattaneo R *et al.* Reprogrammed viruses as cancer therapeutic: targeted, armed and shielded. *Nature reviews-Microbiology* 2008; 6: 529-540
29. Robson T, Hirst DG. Transcriptional targeting in cancer gene therapy. *J Biomed Biotechnol* 2003; (2): 110-137
30. Sadeghi H, Hitt MM. Transcriptionally targeted adenovirus vectors. *Curr Gene Ther* 2005; 5(4): 411-427
31. Kanerva A, Hemminki A. Modified Adenovirus for cancer gene therapy. *Int J Cancer* 2004; 110(4): 475-480
32. Huang TG *et al.* Telomerase-dependent oncolytic adenovirus for cancer treatment. *Gene Ther* 2003; 10(15): 1241-1247
33. Post DE, Fulci G, Chiocca EA, Van Meir EG. Replicative oncolytic herpes simplex viruses in combination cancer therapies. *Curr Gene Ther* 2004; 4: 41-51

34. Chung RY, Saeki Y, Chiocca EA. B-myb promoter retargeting of herpes simplex virus gamma 34.5 gene-mediated virulence toward tumor and cycling cells. *J Virol* 1999; 73: 7556-7564
35. Hernandez-Alcoceba R, Pihalja M, Qian D, Clarke MF. New oncolytic adenovirus with hypoxia- and estrogen receptor- regulated replication. *Hum Gene Ther* 2002; 13: 1737-1750
36. Marples B, *et al.* Development of synthetic promoters for radiation-mediated gene therapy. *Gene therapy* 2000; 7: 511-517
37. Scott SD, Marples B. Radiation-activated antitumor vectors. *Methods Mol Med* 2004; 90: 389-402
38. Curiel DT, Douglas JT. Vector targeting for therapeutic gene delivery. Wiley-Liss, 2002
39. Alemany R, Curiel DT. CAR-binding ablation does not change biodistribution and toxicity of adenoviral vectors. *Gene Ther* 2001; 8: 1347-1353
40. Bouri K, *et al.* Polylysine modification of adenoviral fiber protein enhances muscle cell transduction. *Hum Gene Ther* 1999; 10: 1633-1640
41. Dehecchi MC, Tamanini A, Ionizzato A, Cabrini G. Heparan sulfate glycosaminoglycans are involved in adenovirus type 5 and 2-host cell interactions. *Virology* 2000; 268: 382-390
42. Thomas CE *et al.* Adenovirus binding to the coxsackievirus and adenovirus receptor or integrins is not required to elicit brain inflammation but is necessary to transduce specific neural cell types. *J Virol* 2002; 76: 3452-3460
43. Wickham TJ. Ligand-directed targeting of genes to the site of disease. *Nat Med* 2003; 9: 135-139
44. Varga CM, Wickham TJ, Lauffenburger DA. Receptor-mediated targeting of gene delivery vectors: insights from molecular mechanisms for improved vehicle design. 2000; 70: 593-605
45. Pizzato M, Marlow SA, Blair ED, Takeuchi Y. Initial binding of murine leukemia virus particles to cells does not require specific Env-receptor interaction. *J Virol* 1999; 73: 8599-8611
46. Sharma S, Miyanojara A, Friedmann T. Separable mechanisms of attachment and cell uptake during retrovirus infection. *J Virol* 2000; 74: 10790-10795
47. Sharma S, Murai F, Miyanojara A, Friedmann T. Noninfectious virus-like particles produced by Moloney murine leukemia virus-based retrovirus packaging cells deficient

- in viral envelope become infectious in the presence of lipofection reagents. *Proc Natl Acad Sci USA* 1997; 94: 10803-10808
48. Fueyo J *et al.* A mutant oncolytic adenovirus targeting the Rb pathway produces anti-glioma effect in vivo. *Oncogene* (2000); 19: 2-12
49. Heise C *et al.* An adenovirus E1A mutant that demonstrates potent and selective systemic anti-tumoral efficacy. *Nat Med* (2000); 6: 1134-1139
50. Khuri FR, *et al.* A controlled trial of intratumoral ONYX-015, a selectively-replicating adenovirus, in combination with cisplatin and 5-fluorouracil in patients with recurrent head and neck cancer. *Nat Med* 2000; 6(8): 879-885
51. Bennet JJ, *et al.* Antitumor efficacy of regional oncolytic viral therapy for peritoneally disseminated cancer. *J Mol Med* 2000; 78: 166-174 31ruben161
52. Todo T, Ebright MI, Fong Y and Rabkin SD. Oncolytic herpes simplex virus (G207) therapy for cancer: from basic to clinical. In: Maruta H, editor. *Tumor Suppressing Viruses, Genes, and Drugs-Innovative Cancer Therapy Approaches*. 2001 San Diego: Academic Press p. 45-75
53. Markert JM., Medlock MD., Rabkin SD., Gillespie GY., Todo T., Hunter WD. *et al.* Conditionally replicating herpes simplex virus mutant, G207 for the treatment of malignant glioma: results of a phase I trial. *Gene Therapy* 2000; 7: 867-874.
54. Markert JM *et al.* Phase Ib trial of mutant herpes simplex virus G207 inoculated Pre- and post-tumor resection for recurrent GBM. *Mol Ther* 2009; 17: 199-207
55. Bennet JJ., Delman KA., Burt BM., *et al.* Comparison of safety, delivery, and efficacy of two oncolytic herpes viruses (G207 and NV1020) for peritoneal cancer. *Cancer Gene Ther* 2002; 9: 935-945.
56. Andreansky S *et al.* Treatment of intracranial gliomas in immunocompetent mice using herpes simplex viruses that express murine interleukins. *Gene Therapy* 1998; 5: 121-130
57. Parker JN *et al.* Engineered herpes simplex virus expressing IL-12 in the treatment of experimental murine brain tumors. *Proc Natl Acad Sci USA* 2000; 97: 2208-2213
58. Bennett JJ *et al.* Interleukin 12 secretion enhances antitumor efficacy of oncolytic herpes simplex viral therapy for colorectal cancer. *Ann Surg* 2001; 233: 819-826
59. Wong RJ *et al.* Cytokine gene transfer enhances herpes oncolytic therapy in murine squamous cell carcinoma. *Hum Gene Ther* 2001; 12: 253-265
60. Liu BL *et al.* ICP34.5 deleted herpes simplex virus with enhanced oncolytic, immune stimulating, and anti-tumor properties. *Gene Therapy* 2003; 10: 292-303

61. Todo T, Martuza RL, Dallman MJ, Rabkin SD. *In situ* expression of soluble B7-1 in the contest of oncolytic herpes simplex virus induce potent antitumor immunity. *Cancer Res* 2001; 61: 153-161
62. Liu BL., Robinson M., Han ZQ., Branston RH., English C., Reay P. *et al.* ICP34.5 deleted herpes simplex virus with enhanced oncolytic, immune stimulating, and anti-tumour properties. *Gene Therapy* 2003; 10: 292-303.
63. Fu X, Zhang X. Potent systematic antitumor activity from an oncolytic herpes simplex virus of syncytial phenotype. *Cancer Res* 2002; 62: 2306-2312
64. Fu X *et al.* Expression of a fusogenic membrane glycoprotein by an oncolytic herpes simplex virus potentiates the viral antitumor effect. *Mol Ther* 2003; 7: 748-754
65. Nakamori M, Fu X, Pettaway CA, Zhang X. Potent antitumor activity after systemic delivery of a doubly fusogenic oncolytic herpes simplex virus against metastatic prostatecancer. *Prostate* 2004; 60: 53-60
66. Nakamori M *et al.* Effective therapy of metastatic ovarian cancer with an oncolytic herpes simplex virus incorporating two membrane fusion mechanisms. *Clin. Cancer Res.* 2003; 9: 2727-2733
67. Zhou G, Roizman B. Construction and properties of a herpes simplex virus 1 designed to enter cells solely via the IL-13 α 2 receptor. *PNAS* 2006; 103: 5508-5513
68. Laquerre S, Anderson DB, Stolz DB, Glorioso JC. Recombinant herpes simplex virus type 1 engineered for targeted binding to erythropoietin receptor-bearing cells. *J Virol* 1998; 72: 9683-9697
69. Zhou G, Ye GJ, Debinski W, Roizman B. Engineered herpes simplex virus 1 is dependent on IL13 α 2 receptor for cell entry and independent of glycoprotein D receptor interaction. *Proc Natl Acad Sci USA* 2002; 99: 15124-15129
70. Kamiyama H, Zhou G, Roizman B. Herpes simplex virus 1 recombinant virions exhibiting the amino terminal fragment of urokinase-type plasminogen activator can enter cells via the cognate receptor. *Gene therapy* 2005; 12: 1-9
71. Grandi P, Wang S, Schuback D, Krasnykh V, Spear M, Curiel DT *et al.* HSV-1 virions engineered for specific binding to cell surface receptors. *Mol Ther* 2004; 9: 419-427
72. Nakano K, Asano R, Tsumoto K, Kwon H Goins WF, Kumagai I *et al.* Herpes simplex virus targeting to the EGF receptor by a gD-specific soluble bridging molecule. *Mol Ther* 2005; 11: 617-626

73. Menotti L, Cerretani A, Hengel H, Campadelli-Fiume G. Construction of a fully retargeted herpes simplex 1 recombinant capable of entering cells solely via human epidermal growth factor receptor2. *J Virol*. 2008; 82: 10153-10161
74. Burton EA, Bai Q, Goins WF, Glorioso JC. Targeting gene expression using HSV vectors. *Adv Drug Deliv Rev* 2001; 53: 155-170
75. Miyatake S., Iyer A., Martuza RL., Rabkin SD. Transcriptional targeting of herpes simplex virus for cell-specific replication. *J Virol* 1997; 71: 5124-5132.
76. Miyatake SI, Tani S, Feigenbaum F, *et al.* Hepatoma-specific antitumor activity of an albumin enhancer/promoter regulated herpes simplex virus in vivo. *Gene Ther* 1999; 6: 564-572
77. Yamamura H, Hashio M, Noguchi M, *et al.* Identification of the transcriptional regulatory sequences of human calponin promoter and their use in targeting a conditionally replicating herpes vector to malignant human soft tissue and bone tumors. *Cancer Res*. 2001, 61: 3969-3977
78. Hallenbeck P.L., Ghang Y.N., Hay C., Golightly D., Stewart D., Lin J., Phipps S., Chiang Y.L. A novel tumor-specific replication-restricted adenoviral vector for gene therapy of hepatocellular carcinoma. *Hum Gene Ther* 1999; 10: 1721-1733.
79. Tsukuda K., Wiewrodt R., Molnar-Kimber K., Jovanovic V.P., Amin K.M. An E2F-responsive replication-selective adenovirus targeted to defective cell cycle in cancer cells: potent antitumoral efficacy but no toxicity to normal cell. *Cancer Res* 2002; 62: 3438-3447.
80. Post D.E. & van Meir E.G. A novel hypoxia-inducible factor (HIF) activated oncolytic adenovirus for cancer therapy. *Oncogene* 2003; 22: 2065-2072.
81. Wirt T., Zender L., Schulte B., Mundt B., Plentz R., Rudolph K.L., Manns M., Kubicka S., Kuhnel F. A telomerase-dependent conditionally replicating adenovirus for selective treatment of cancer. *Cancer Res* 2003; 63:3181-3188.
82. Neutrath AR, Strick N. The putative cell receptor for hepatitis B virus (HBV), annexin V, and apolipoprotein H, bind to lipid components of HBV. *Virology* 1994; 204: 475-477
83. Neutrath AR, Kent SB, Strick N, Parker K. Identification and chemical synthesis of a host cell receptor binding site on hepatitis B virus. *Cell* 1986; 46: 429-436
84. Petit MA *et al.* HepG2 cell binding activities of different hepatitis B virus isolates: inhibitory effect of anti-HBs and anti.preS1 (21-47). *Virology* 1991; 180: 483-491
85. Petit MA, Capel F, Dubanchet S, Mabit H. PreS1-specific binding proteins as potential receptors for hepatitis B virus in human hepatocytes. *Virology* 1992; 187: 211-222

86. Krisky DM., Marconi PC., Oligino T., Rouse RJ., Fink DJ., Glorioso JC. Rapid method for construction of recombinant HSV gene transfer vectors. *Gene Ther* 1997; 4:1120-1125.
87. Miyatake S-I *et al.* Hepatoma-specific antitumor activity of an albumin enhancer/promoter regulated herpes simplex virus *in vivo*. *Gene Ther* 1999; 6: 564-572
88. Nomura N. *et al.* Considerations for intravascular administration of oncolytic hebras virus for treatment of multiple liver metastases. *Cancer Chemother Pharmacol.* 2007.
89. Yuanhao Li *et al.* A hepatocellular carcinoma-specific adenovirus variant, CV890, eliminates distant human liver tumors in combination with doxorubicin. *Cancer Res* 2001; 61: 6428-6436.
90. Advani S.J, Weischselbaum R.R, Chmura S.J. Enhancing radiotherapy with genetically engineered viruses. *J. Clin. Oncol.* 2007; 25 (26): 4090-4095.