

Ultrasonic PhageKiss!

Piattaforma modulare di vettori fagici per terapia sonodinamica

Tutor proponente: A. Danielli

Progetto di ricerca

Abstract

IT - Oggetto della ricerca è una piattaforma di vettori fagici capace di mediare l'ablazione selettiva di cellule tumorali o di batteri patogeni in applicazioni di terapia sonodinamica (SDT). Il vettore fagico, di per sé innocuo per le cellule dell'ospite, è decorato sulla superficie con centinaia di molecole che solo in seguito ad esposizione a ultrasuoni producono specie reattive dell'ossigeno, citotossiche per la cellula bersaglio. Il vettore può poi essere facilmente reingenerizzato per esporre diversi ligandi cellula-specifici, per bersagliare in principio qualsiasi tipo di cellula/patogeno. Per cogliere appieno le potenzialità traslazionali della piattaforma fagica SDT ci si prefigge lo sviluppo di modelli in-vivo, cellulari od animali, che confermino l'efficacia del trattamento anche a livello pre-clinico più avanzato. In accordo all'attuale legislazione nell'ambito della protezione degli animali utilizzati ai fini scientifici, l'assegnista è chiamato a sviluppare due modelli alternativi a quelli murini: i) per applicazioni antitumorali perseguirà una sperimentazione su tumori mammari HER2+ utilizzando modelli cellulari 3D (sferoidi), che meglio mimano la complessità del tessuto tumorale rispetto alle linee cellulari; ii) per applicazioni antimicrobiche svilupperà un modello animale di insetto (*Galleria melonella*), approvato come valido sostituto per test antimicrobici in vivo, per confermare l'efficacia della piattaforma contro ceppi clinici di batteri antibiotico-resistenti (superbugs).

UK - The proposed research activity pertains to a platform of phage vectors capable of mediating the selective ablation of tumor cells or pathogenic bacteria in sonodynamic therapy (SDT) applications. The phage vector, itself harmless to host cells, is decorated on the capsid surface with hundreds of sensitizer molecules that produce reactive oxygen species, cytotoxic to the target cell, only after ultrasound exposure. The vector can be easily engineered to expose different cell-specific ligands, to target in principle any type of cell/pathogen. In order to fully grasp the translational potential of the SDT phage platform, we aim to develop in-vivo, cellular or animal models that confirm the efficacy of the treatment even at a more advanced pre-clinical level. In accordance with current legislation in the field of animal protection used for scientific purposes, the assignee is called upon to develop two alternative models to mouse models: (i) for anti-tumour applications, she/he will pursue experimentation on HER2+ breast tumours using 3D cellular models (spheroids), which better mimic the complexity of the tumour tissue than cell lines; (ii) for antimicrobial applications, she/he will develop an animal insect model (*Galleria melonella*), approved as a valid substitute for in vivo antimicrobial testing, to confirm the efficacy of the phage vector platform against clinical strains of antibiotic-resistant bacteria (superbugs).

Introduzione

La terapia sonodinamica (SDT) è un approccio terapeutico nanotecnologico innovativo minimamente invasivo che presenta il vantaggio di essere focalizzabile. Prevede una combinazione di ultrasuoni e agenti chimici specializzati noti come sonosensibilizzatori. L'attivazione del sensibilizzatore da parte degli ultrasuoni genera specie reattive dell'ossigeno (ROS) responsabili della citotossicità. Gli ultrasuoni, potendo penetrare più in profondità nei tessuti rispetto all'irradiazione luminosa, permettono il trattamento anche in regioni profonde del corpo. A titolo di esempio, l'ultrasuono può essere focalizzato in una regione di un tumore per attivare un sonosensibilizzatore, offrendo così la possibilità di colpire i tumori solidi in maniera mirata.

Oppure l'ultrasuono può essere indirizzato a un ascesso chirurgico o un'infezione subcutanea per debellare batteri antibiotico-resistenti (superbugs), che altrimenti non lasciano altra scelta se non quella di utilizzare farmaci desueti, che hanno gravi effetti collaterali sul paziente.

La spendibilità di know-how in questo campo è molto elevata: le nanoscienze sono considerate tra i principali obiettivi di sviluppo da tutti i maggiori paesi industrializzati. Il mercato globale dei prodotti nanotecnologici per la medicina e l'ambiente raggiungerà gli 85 miliardi di euro nel 2021, con un tasso di crescita annua del 18.2%. Il mercato degli antibatterici ha una prospettiva di crescita per il 2022 superiore ai 30 miliardi di euro. Per terapia fotodinamica, affine alla SDT, si stima una crescita di mercato annua del 7.30% (3 miliardi di euro nel 2022).

Nonostante SDT presenti un enorme potenziale clinico, sia nell'ambito della terapia antitumorale che per il trattamento di batteri antibiotico-resistenti, uno dei suoi principali limiti è legato alle alte potenze di ultrasuoni da mettere in campo per ottenere un'attivazione di sonosensibilizzatori tale da risultare efficace. Di contro, un eccesso di potenza dell'ultrasuono danneggia anche i tessuti sani. Inoltre i sonosensibilizzatori devono essere indirizzati selettivamente alle cellule bersaglio per non danneggiare le cellule sane circostanti. Una soluzione (vettore) che permettesse di associare basse potenze ultrasoniche a un indirizzamento specifico di un numero sufficiente di sonosensibilizzatori avrebbe quindi un impatto dirompente nel campo e ottime prospettive di sviluppo, con una corte ampia di applicazioni e pazienti che beneficerebbero dei vantaggi offerti.

La soluzione di PhageKiss! consiste nell'utilizzo di una piattaforma di vettori, basata sul batteriofago M13, per l'eliminazione selettiva di cellule batteriche o tumorali in applicazioni di SDT. I batteriofagi (o fagi) sono virus ubiquitari che infettano i batteri ma sono inattivi contro le cellule eucariotiche. Essi sono biocompatibili, uniformi nelle dimensioni e nella morfologia, relativamente stabili ad alte temperature, in un'ampia gamma di condizioni. Per questo, fagi come M13 ricevono un'attenzione crescente come piattaforma proteica ordinata per l'assemblaggio di molecole funzionali e materiali nanostrutturati. Molecole di indirizzamento ed effettori terapeutici possono essere facilmente esposti o coniugati sulla loro superficie. M13 può essere indirizzato virtualmente a qualsiasi tipo di cellula attraverso l'esposizione di specifici peptidi o anticorpi. Inoltre, l'eccellente profilo di sicurezza lo rende molto adatto per applicazioni in vivo. È stato anche dimostrato che M13, e ancora di più alcune sue forme modificate, sono in grado di attraversare la barriera ematoencefalica, notoriamente refrattaria al passaggio di farmaci e chemioterapici convenzionali.

Grazie alla modularità della piattaforma, i fagi sono facilmente reingegnerizzati per esporre diversi ligandi cellula-specifici, così da poter raggiungere lo specifico bersaglio, che spazia quindi dalla cellula tumorale al batterio farmaco-resistente. Allo stesso tempo il fago può essere decorato con migliaia di sonosensibilizzatori aumentando il numero veicolato per singolo evento di legame: questo aumenta esponenzialmente l'efficacia della SDT poiché si ha attivazione anche a bassissime potenze ultrasoniche. Suggestivamente, si potrebbe immaginare di utilizzare un comune ecografo per distruggere in maniera mirata una massa tumorale, o un tumore a cellule diffuse, non altrimenti attaccabile chirurgicamente.

La piattaforma fagica SDT si presenta come versatile e capace di essere declinata *ad hoc* per applicazioni specifiche e peculiari. Si presta, infatti, ad interventi di medicina personalizzata purché i) siano disponibili molecole/anticorpi per l'indirizzamento specifico, ii) la parte del corpo interessata al trattamento sia accessibile agli ultrasuoni.

Obiettivi del progetto

Le potenzialità di un'invenzione in campo biomedico-farmaceutico sono strettamente legate alla sua **valorizzazione preclinica**. È importante che l'azione citotossica selettiva di PhageKiss! sia dimostrata in diversi contesti preclinici, validandone il carattere di **piattaforma**, e rendendo così i risultati della ricerca più attrattivi per capitali d'investimento o anche per la creazione di spin-off.

I modelli preclinici di riferimento sono generalmente quelli murini. Tuttavia, i termini del bando PoC sul quale si incentra il progetto proposto non permettono di impostare una adeguata sperimentazione con questi modelli. Pertanto, in accordo all'attuale legislazione italiana (DL 4 marzo 2014) ed europea nell'ambito della protezione degli animali utilizzati ai fini scientifici, l'assegnista sarà chiamato a sviluppare due modelli alternativi, ma non esclusivi, per la validazione preclinica di PhageKiss!:

i) per **applicazioni antitumorali** dell'invenzione si perseguirà una sperimentazione su tumori mammari HER2+ utilizzando modelli cellulari 3D (sferoidi), che meglio mimano la complessità del tessuto tumorale rispetto alle linee cellulari. I modelli in 3D sono un efficace strumento per la scoperta e sviluppo di nuovi farmaci antitumorali, dando informazioni sulla penetrazione della terapia e sull'eterogeneità del tumore stesso. Questo consente di accelerare lo sviluppo preclinico e fornire i risultati necessari alle future e auspicabili applicazioni di PhageKiss!

La scelta del tumore mammario come modello deriva dalla rilevanza clinica dei tumori HER2+ per l'elevata incidenza a livello mondiale e per il fatto che solo un sottoinsieme di pazienti risponde alle terapie disponibili. Inoltre, la maggior parte dei pazienti che inizialmente rispondono alla terapia standard sviluppa resistenza entro un anno dall'inizio del trattamento. C'è quindi un incalzante bisogno di nuovi approcci terapeutici.

ii) per validare **applicazioni antimicrobiche** si farà uso di modello animale di insetto (*G. melonella*), le cui larve possono essere utilizzate nelle prove di infettività, rappresentando un'alternativa conveniente ed eticamente vantaggiosa di sperimentazione animale su ceppi clinici di batteri antibiotico-resistenti (superbugs). Questi rappresentano una delle minacce più grandi che la comunità deve affrontare a livello globale. Secondo un rapporto del Interagency Coordinating Group on Antimicrobial Resistance istituito appositamente da OMS e ONU, ogni anno 700mila persone muoiono per infezioni antibiotico-resistenti, con prospettive di peggioramento in mancanza nuove terapie alternative. In particolare, ai fini del bando si propone di validare l'efficacia di PhageKiss! contro batteri antibiotico-resistenti, appartenenti al gruppo dei patogeni Gram-negativi elencati nella *priority list* dell'OMS.

Infine l'assegnista sarà chiamato, attraverso questo progetto, a fornire una *value proposition* basata sulla validazione preclinica in vivo, da proporre a fondi venture capital/seed per creare una spin-off-up dedicata alla valorizzazione di mercato della piattaforma fagica, o a una società licenziataria interessata a sviluppare specifiche applicazioni della tecnologia (incl. sviluppo clinico).

Piano della attività (sviluppo tecnico e valorizzazione della ricerca)

Il piano di sviluppo tecnico è diviso in due workpackages principali (WP1 e WP2), ciascuno caratterizzato da 3 tasks (T). WP3 è dedicato alla valorizzazione dei risultati della ricerca.

WP1 – SDT fago-mediata su sferoidi di tumore mammario HER2+

T1.1 Ingegnerizzazione di fagi con tropismo selettivo verso HER2 (M1-6)

Le sequenze note di anticorpi con attività di legame selettiva per HER2 saranno clonate in frame in un vettore fagemidico per permetterne l'esposizione in multivalenza sulla punta del fago. I fagi ottenuti saranno coniugati con fluorofori per monitorare al microscopio o al citofluorimetro il reindirizzamento atteso verso le linee cellulari HER2+.

T1.2 Coniugazione dei sonosensibilizzatori e caratterizzazione del tropismo e dell'attività SDT in vitro (M1-12)

I fagi ingegnerizzati in T1.1 saranno purificati in quantità e coniugati ai sonosensibilizzatori utilizzando protocolli di coniugazione già ottimizzati dal gruppo. I fagi funzionalizzati saranno purificati, caratterizzati per la produzione di ROS e validati per l'attività SDT in vitro su un pannello di linee tumorali che sovraesprimono HER2 (BT-474, FK-OV3) e controlli negativi (MDA-MB-231). Verranno condotti saggi per studiare l'impatto cellulare, molecolare e genetico del trattamento.

T1.3 SDT fago-mediata su modelli 3D (sferoidi) HER2+ (M1-18)

Saranno allestiti modelli 3D di sferoidi di cellule HER2+ e relativi controlli negativi per valutare la capacità di penetrazione tumorale dei fagi e analizzare l'attività citotossica e citostatica dei fagi in SDT utilizzando un sonotrodo fisioterapico. Possibilmente sarà testata l'efficacia SDT anche su sferoidi derivati da campioni ex vivo di pazienti affette da cancro al seno.

WP2 – SDT fago-mediata su di batteri Gram(-) antibiotico-resistenti

T2.1 Ingegnerizzazione di fagi con tropismo selettivo verso batteri patogeni Gram(-) (M1-6)

Analogamente a T1.1 i geni sintetici che codificano per peptidi e/o anticorpi specifici contro bersagli superficiali esposti di Enterobatteri patogenici, Klebsella pneumoniae, Acinetobacter baumannii e Pseudomonas aeruginosa saranno clonate in frame con il vettore fagemidico per l'esposizione in multivalenza sull'fago. Microscopia a fluorescenza e conta citofluorimetrica permetteranno di validare il reindirizzamento.

T2.2 Coniugazione dei sonosensibilizzatori e caratterizzazione del tropismo e dell'attività antimicrobica SDT in vitro (M1-12)

La coniugazione seguirà le stesse modalità descritte in T1.1. Saggi di attività antimicrobica SDT in vitro verranno allestiti per ceppi clinici antibiotico-resistenti delle specie sopra descritte. A tal fine verrà fatto vantaggiosamente uso di un protocollo di screening high-throuput già sviluppato dal gruppo.

T2.3 SDT fago-mediata in vivo su modello di larve di Galleria melonella (M1-24)

I fagi più performanti in T2.2 saranno scelti per contrastare dosi batteriche infettive letali iniettate nell'emocele delle larve di Galleria in saggi di SDT fago-mediata utilizzando un sonotrodo fisioterapico. L'efficienza del trattamento sarà valutata registrando giornalmente i tassi di mortalità larvale.

Milestones

- | | |
|---------|---|
| mese 6 | MS1.1 Fagi reindirizzati selettivamente a recettore HER2 |
| | MS2.1 Fagi reindirizzati selettivamente a batteri patogeni Gram(-) |
| mese 12 | MS1.2 Validazione in vitro SDT selettiva per linee cellulari HER2+ |
| | MS2.2 Validazione in vitro SDT su batteri antibiotico-resistenti Gram(-) |
| mese 24 | MS1.3 Validazione SDT fago-mediata su sferoidi HER2+ |
| | MS2.3 Validazione SDT antimicrobica in vivo su batteri antibiotico resistenti |

WP3– Attività generali e potenziamento

T3.1 Gestione e disseminazione dell'idea (M1-24)

Oltre a gestione ordinaria e supervisione tecnica, il progetto prevede un'attiva continuazione delle attività di disseminazione dell'idea brevettuale tra la comunità scientifica come anche delle attività di divulgazione e sensibilizzazione verso *stakeholder* privati e pubblici (industria, investitori, amministrazioni, istituti di ricerca, associazioni di pazienti etc) per generare interesse e consapevolezza sul progetto e sui risultati attesi.

Obiettivo: impostare strategie e piano d'azione per massimizzare la riuscita scientifica e la rilevanza applicativa del progetto.

T3.2 Promozione dei risultati (M12-24)

La diffusione dei risultati scientifici avverrà attraverso la pubblicazione di articoli su riviste internazionali di rilievo e attraverso la partecipazione a conferenze e congressi. In questa fase è anche prevista la

partecipazione a bandi con l'obiettivo di promuovere la raccolta di fondi per il finanziamento delle coperture brevettuali, facendo anche leva sui contatti di collaborazione che già ruotano intorno alla idea brevettuale di PhageKiss!. Per il *relationship building* prevediamo la partecipazione ad almeno due eventi per promuovere la *lead generation* intorno al progetto. Obiettivo: impostare strategie e piani d'azioni per la favorire la successiva *exploitation* dei risultati ottenuti dal progetto.

T3.3 Valorizzazione (M18-24)

Nell'ultimo semestre, alla luce dei risultati ottenuti saranno contattati (attraverso canali istituzionali, B2B lead generation di cui al Task 3.2, o altre azioni) partner, industrie med-tech e investitori (Accelerator/Seed Capital, VC) attivi nel campo delle nanobotecnologie mediche per cercare di: a) licenziare la tecnologia e garantire l'impegno del licenziatario per far avanzare ulteriormente il livello di TRL o b) trovare partners finanziari e soci privati interessati a supportare una Spin-OFF dedicata all'ulteriore sviluppo di mercato dei risultati della ricerca.

Gli obiettivi in quest'ultima fase mireranno a i) valutare più approfonditamente la libertà di operare sul campo (vincoli PI), ii) valutare il panorama di mercato delle specifiche applicazioni iii) identificare e definire insieme ai partner il modello di business e redigere il relativo business plan; iv) prevedere possibili azioni di promozione e sviluppo del business per assicurare uno sfruttamento mirato dei risultati emergenti ai soci; v) partecipare a call for SpinOff projects.

Piano formativo dell'assegnista

Il progetto si propone di far acquisire al beneficiario dell'assegno competenze specifiche prevalentemente molecolari, cellulari e nanobiotecnologiche, da acquisire presso il laboratorio del proponente (FaBiT) e presso i laboratori dei Proff. Calvaresi (CIAMICIAN) e Turrini (QuVi) che collaborano al progetto PhageKiss! .

L'assegnista parteciperà al progetto Proof-of-Concept (PoC) "PhageKiss!" finanziato dall'Università di Bologna per la valorizzazione di un brevetto recentemente depositato dal tutor proponente. Nell'ambito delle attività previste dal progetto l'assegnista sarà anche tenuto a sviluppare competenze di *bioentrepreneurship* per la valorizzazione dei risultati di ricerca.

In dettaglio il piano di PhageKiss! è finalizzato a:

- a) formazione dell'assegnista in merito alle potenzialità biotecnologiche offerte dalla manipolazione genetica dei fagi filamentosi (phage display, targeting etc)
- b) formazione in merito alle potenzialità nanotecnologiche dei fagi filamentosi derivanti dalla coniugazione chimica di sensitizer e molecole (applicazioni teranostiche)
- c) acquisizione delle competenze necessarie alle colture cellulari 2D e 3D (sferodi), e ai saggi di vitalità e citotossicità associati.
- d) formazione di un ricercatore esperto nell'utilizzo di sonotrodi fisioterapici e di applicazioni cliniche di ultrasuoni
- e) formazione di un esperto in grado di utilizzare strumentazioni avanzate per la valutazione del retargeting di vettori teranostici, come citometria a flusso e microscopia confocale;
- f) acquisizione di competenze per l'implementazione di saggi antibatterici in modello animale invertebrato
- g) se i risultati saranno incoraggianti, l'assegnista sarà chiamato ad acquisire competenze e *soft skills* utili per valorizzazione della proprietà intellettuale e per la creazione di una spin-OFF universitaria.