

Tutor: Dott.ssa Tatiana Gianni

TITOLO DEL PROGETTO

Development and Preclinical Characterization of Retargeted, Oncolytic Herpes Viruses for Precision Medicine

ABSTRACT DEL PROGETTO

To enter cell, human herpes simplex virus (HSV) uses both viral fusion glycoproteins gH/gL/gB and viral glycoprotein gD that is responsible for cell/tissue tropism. Glycoprotein gD has been previously engineered with a single chain antibody specific for the Tumour Associated Antigen (TAA), that is over-expressed by some types of cancer cells. The recombinant virus enters cells through the TAA only and has lost the ability to infect the cells that are the natural targets of HSV infection. First generation oncolytic HSV (oHSV) was HER2-retargeted (o-HSV-HER2ret). This oHSV has been shown to efficiently kill cancer cells both *in vitro* and *in vivo* models and to induce a local and systemic antitumour immune response, which induces immune-mediated tumour regression. The expression of IL-12 by o-HSV-HER2ret (second generation oHSV) improved the efficacy the oHSV in reprogramming the tumour microenvironment (TMA) and exerting a potent antitumour effect. Third generation oHSVs have been developed to express a new array of immunostimulatory cytokines. New applications for third-generation oHSVs will be considered to 1) intra tumoral administrate of oHSVs retarget to HER2 coding immune stimulatory molecules in preclinical models: doses, schedules, combinations with immunotherapies, and 2) test new oHSVs retargeted to novel cancer-specific receptors. New membrane antigens specifically expressed by human tumour cells were identified and new viruses redirected against these targets were generated. These viruses will be tested *in vivo* to characterise their ability to induce anti-tumour activity and to protect against the implantation of new challenge tumours.

PIANO DELLE ATTIVITÀ DELL'ASSEGNISTA

The research fellow will carry out all the laboratory work required to maintain and expand the C57Bl/6 WT and Balb/c huHER2 colonies. More specifically, he/she will help in the general husbandry to maintain the colony, will plan and follow the breeding, will wean and mark the pups, will genotype the mice. Both a subcutaneous tumour models will be established using different doses of syngeneic cancer cell lines transgenically expressing the TAA(s). Mice will be monitored after the tumour induction and the tumour mass will be measured. Administration of the oncolytic virus will be performed both locally and systemically. Harvesting and preparation of organs and serum will be carried out at the end of the experiment to proceed with analysis of the tumour and the tumour-specific immune response.

L'assegnista si occuperà del lavoro di laboratorio richiesto per mantenere ed espandere le colonie murine di C57Bl/6 WT e Balb/c huHER2. Più nello specifico, si occuperà dell'allevamento, dell'accoppiamento, dello svezzamento, della marcatura e genotipizzazione dei nuovi nati. Saranno stabiliti nuovi modelli sottocutanei tumorali utilizzando diverse dosi di cellule cancerose singeniche esprimenti il TAA contro cui saranno diretti il virus oncolitici. I topi saranno monitorati dopo l'induzione tumorale per valutare e misurare lo sviluppo della massa. La somministrazione dei virus oncolitici sarà fatta localmente. Il prelievo e la preparazione degli organi e del siero alla fine dell'esperimento saranno eseguiti per analizzare il tumore e la risposta immunitaria tumore-specifica. Sarà necessario valutare sia la risposta B che la risposta T e la produzione di IFN γ in ogni singolo esperimento.



DIPARTIMENTO DI SCIENZE MEDICHE E CHIRURGICHE

Modulo richiesta assegno

TUTOR	Tatiana Gianni		
PRODUZIONE SCIENTIFICA TUTOR <u>NELL'ULTIMO QUADRIENNIO</u>			
	ARTICOLO (autori, titolo, rivista, anno)	INDICE UNICO	Punti
3 lavori in extenso su riviste indicizzate con valutazione indice unico da VRA2022	Tomassi S.; D'Amore V.M.; Di Leva F.S.; Vannini A.; Quilici G.; Weinmuller M.; Reichart F.; Amato J.; Romano B.; Izzo A.A.; Di Maro S.; Novellino E.; Musco G.; Gianni T.; Kessler H.; Marinelli L. Halting the Spread of Herpes Simplex Virus-1: The Discovery of an Effective Dual $\alpha v\beta 6/\alpha v\beta 8$ Integrin Ligand. JOURNAL OF MEDICINAL CHEMISTRY, 2021	0,96	1
	Vannini A.; Leoni V.; Barboni C.; Sanapo M.; Zaghini A.; Malatesta P.; Campadelli-Fiume G.; Gianni T. $\alpha v\beta 3$-integrin regulates PD-L1 expression and is involved in cancer immune evasion. PROCEEDINGS OF THE NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES OF THE UNITED STATES OF AMERICA, 2019	0,92	1
	Gianni T.; Leoni V.; Sanapo M.; Parenti F.; Bressanin D.; Barboni C.; Zaghini A.; Campadelli-Fiume G.; Vannini A. Genotype of Immunologically Hot or Cold Tumors Determines the Antitumor Immune Response and Efficacy by Fully Virulent Retargeted oHSV. VIRUSES, 2021	0,83	0,80
Totale			2,80



DIPARTIMENTO DI SCIENZE MEDICHE E CHIRURGICHE

**DISSEMINAZIONE SCIENTIFICA E ATTIVITÀ DI TERZA MISSIONE
TUTOR NELL'ULTIMO QUADRIENNIO**

Tipologia (seminario, congresso nazionale, congresso internazionale, attività di terza missione inserita su catalogo IRIS)	Titolo	Punti
<i>aggiungere linee se necessario</i>		
Totale		

Commissione proposta 3 commissari + 1 supplente	Gianni Tatiana PA-DIMEC (presidente)
	Zaghini Anna PO-DIMIVET
	Vannini Andrea RTDB-FaBiT (segretario)
	Cristina Forghieri Tecnico D- DIMEC

TITOLO DEL PROGETTO			
A Preclinical, Precision Medicine Approach Based on Retargeted Herpesviruses with Oncoimmuno therapeutic Potential (PreMeRetHOn)			
ASSEGNO FINANZIATO DA PROGETTO COMPETITIVO <i>(barrare la casella corrispondente)</i>	<input checked="" type="checkbox"/> SI	<input type="checkbox"/> NO	<i>Punti</i>



DIPARTIMENTO DI SCIENZE MEDICHE E CHIRURGICHE

SE IL FINANZIAMENTO È COMPETITIVO L'ENTE FINANZIATORE	PRIN 2022	
PROGETTO/ATTIVITÀ A SCOPO COMMERCIALE <i>(es. sperimentazione profit)</i>	<input type="checkbox"/> SI	<input checked="" type="checkbox"/> NO
CARATTERISTICHE DEL PROGETTO <i>(biomedico/osservazionale/clinico- interventistico/multidisciplinare)</i>	Multidisciplinare	
STATO DI APPROVAZIONE DEL PROGETTO DA PARTE DEL COMITATO ETICO <i>(se necessario per il tipo di studio barrare o evidenziare la casella corrispondente)</i>	<input type="checkbox"/> Ottenuto	<input type="checkbox"/> Da ottenere
DESCRIZIONE DEL PROGETTO <i>(max 800 parole)</i>	Punti	
(1)obiettivi, (2)materiali e metodi, (3) risultati/impatto attesi, (4) attività formativa e (5) di ricerca dell'assegnista		
<p>Obiettivi: La viroterapia oncolitica sfrutta l'abilità dei virus di infettare e uccidere le cellule tumorali per generare agenti terapeutici tumore-specifici. Nel laboratorio coordinato dalle Prof.ssa T. Gianni sono stati ingegnerizzati virus Herpes simplex 1 oncolitici reindirizzati (retargeted) al recettore huHER2 (oHSV-HER2) un oncogene iper-espresso in diversi tumori e il reindirizzamento verso huHER2 ha permesso lo sviluppo di terapie oncolitiche in grado di colpire i tumori esprimenti huHER2. Uno degli obiettivi del progetto è verificare se oHSV-HER2 armati con molecole co-stimolatorie del sistema immunitario siano candidati migliori nel trattamento di tumori HER2 positivi. Gli herpesvirus oncolitici reindirizzati rientrano nell'approccio chiamato "Precision Medicine", o Medicina di Precisione; nello specifico non sono agenti pan-tumorali, in grado di esercitare il proprio effetto verso qualsiasi tipo di tumore, ma sono disegnati per colpire specifici target tumorali e quindi specifici gruppi di tumori. L'approccio "Precision Medicine" ha come risultato un alto livello di Sicurezza, in quanto impedisce che l'herpesvirus oncolitico vada a colpire tessuti sani, i quali non esprimono il marcatore selezionato. Tale approccio richiede la generazione di una pluralità di herpesvirus oncolitici, ognuno specifico per un target tumorale molecolare e pertanto specifico per il "gruppo" di tumori su cui si vuole intervenire. Obiettivo principale dello studio è la messa a punto e l'ottimizzazione di modelli di tumori murini impiantati in topi singeneici immunocompetenti. Questi modelli saranno impiegati successivamente per condurre valutazioni sull'efficacia antitumorale di virus herpes simplex oncolitici reindirizzati verso i recettori tumorali umani (huPSMA, huMUC1 e huNect4). Il laboratorio proponente il progetto ha una consolidata esperienza pluriennale nel campo del retargeting del herpes oncolitico, ciò consente di padroneggiare le tecnologie necessarie per eseguire il lavoro proposto. La sperimentazione sugli animali è svolta presso la struttura del Dipartimento di Medicina Veterinaria, sotto la supervisione e responsabilità della Prof.ssa Anna Zagnini. I Protocolli per gli esperimenti descritti sono stati approvati dal Ministero della Salute a nome della Prof.ssa Anna Zaghini.</p> <p>Materiali e metodi: Poiché gli herpesvirus oncolitici reindirizzati richiedono specificamente la presenza dei rispettivi recettori umani per poter infettare le cellule tumorali murine, esse sono state ingegnerizzate per esprimere in modo stabile, come transgeni, le isoforme umane di PSMA, MUC1, Nect4 HER2. Verranno utilizzati sia topi C57BL/6 che topi BALB/c (sia maschi che femmine) impiantati con cellule tumorali singeniche rese transgeniche per l'espressione degli antigeni tumorali umani di interesse: huPSMA, huMUC1, huNect4 e huHER2 e i virus oncolitici saranno somministrati per via intratumorale. Saranno stabiliti modelli sottocutanei tumorali utilizzando diverse dosi di cellule cancerose singeniche esprimenti i vari antigeni tumorali.</p> <p>Risultati/impatto attesi: Si ci aspetta da un lato che i nuovi oHSV-HER2 armati con molecole co-stimolatorie siano agenti onco-immuno-terapici migliori rispetto alla controparte non armata e dall'altro che i nuovi herpesvirus oncolitici abbiano un effetto antitumorale specifico verso cellule tumorali che esprimono l'antigene</p>		



DIPARTIMENTO DI SCIENZE MEDICHE E CHIRURGICHE

tumorale rispetto al quale sono reindirizzati. Questi virus, inoltre, dovrebbero indurre una risposta antitumorale adattativa che dovrebbe inibire la crescita di tumori distali mediante un meccanismo immunoterapeutico.

Attività formativa e di ricerca dell'assegnista. L'assegnista si occuperà del lavoro di laboratorio richiesto per mantenere ed espandere le colonie murine di C57Bl/6 WT e Balb/c huHER2. Più nello specifico, si occuperà dell'allevamento, dell'accoppiamento, dello svezzamento, della marcatura e genotipizzazione dei nuovi nati. Saranno stabiliti nuovi modelli sottocutanei tumorali utilizzando diverse dosi di cellule cancerose singeniche esprimenti il TAA contro cui saranno diretti i diversi virus oncolitici. I topi saranno monitorati dopo l'induzione tumorale per valutare e misurare lo sviluppo della massa. La somministrazione dei virus oncolitici sarà fatta localmente. Il prelievo e la preparazione degli organi e del siero alla fine dell'esperimento saranno eseguiti per analizzare il tumore e la risposta immunitaria tumore-specifica. Sarà necessario valutare sia la risposta B che la risposta T e la produzione di IFN γ in ogni singolo esperimento.

DESCRIZIONE DELLE ATTIVITÀ DELL'ASSEGNISTA

(per i **nuovi** assegni: max 400 parole; competenze richieste, scansione temporale della formazione, scansione temporale dell'attività, obiettivi primari e secondari)

(per i **rinnovi**: max 600 parole – da integrare con la relazione dell'assegnista; formazione raggiunta, attività effettuata, obiettivi raggiunti/competenze acquisite, formazione ancora da acquisire (se pertinente), scansione temporale dell'attività durante il rinnovo)

Punti

L'assegnista si occuperà del lavoro di laboratorio richiesto per mantenere ed espandere le colonie murine di C57Bl/6 WT e BALB/c huHER2. Più nello specifico, si occuperà dell'allevamento, dell'accoppiamento, dello svezzamento, della marcatura e genotipizzazione dei nuovi nati. Saranno stabiliti modelli sottocutanei tumorali utilizzando diverse dosi di cellule cancerose singeniche esprimenti huPSMA, huMUC1, huNect4 e huHER2. I topi saranno monitorati dopo l'induzione tumorale per valutare e misurare lo sviluppo della massa. I vari virus reindirizzati somministrati per via intratumorale e sarà necessario valutare la migliore dose ed eventuali necessità di somministrazioni ripetute. Il prelievo e la preparazione degli organi e del siero alla fine dell'esperimento saranno eseguiti per analizzare il tumore e la risposta immunitaria tumore-specifica. Parte dell'attività di ricerca verrà svolta sotto la supervisione della Prof.ssa Anna Zaghini (DIMEVET).

SE RINNOVO, SI RICORDA DI ALLEGARE ANCHE LA RELAZIONE DELL'ASSEGNISTA CON LA SUA PRODUZIONE SCIENTIFICA.

Scheda attività assistenziale (se prevista)

ATTIVITÀ ASSISTENZIALI DELL'ASSEGNISTA/ N. ORE SETTIMANA
NESSUNA
AZIENDA SANITARIA PRESSO CUI SI SVOLGERÀ L'ATTIVITÀ



DIPARTIMENTO DI SCIENZE MEDICHE E CHIRURGICHE

Si ricorda che, come previsto dagli Accordi sull'impiego nell'attività assistenziale dei Titolari di assegni di ricerca, sottoscritti tra l'Università di Bologna e le Aziende Ospedaliere di riferimento, una volta stipulato il contratto con il vincitore della selezione, il tutor deve consegnare alla Direzione Medica Ospedaliera la relativa modulistica, nella quale andranno riportate le attività qui segnalate.