

## Verbale LM Bioinformatica parti sociali 2021

### **The BSc and the MSc in Biotechnology of the University of Rome Tor Vergata meet biotech companies**

Sono stati organizzati una serie di incontri con i rappresentanti di alcune aziende Biotech della nostra regione, in particolare con le aziende del polo di Castel Romano (Roma). I seminari sono stati tenuti in lingua inglese sulla piattaforma Teams al seguente link:

<https://teams.microsoft.com/l/channel/19%3a0e56a4479dd4f4c91f11cd3a7b090aa%40thread.tacv2/Generale?groupId=e2608e3b-924e-4f10-9415-c9975b60c2cc&tenantId=24c5be2a-d764-40c5-9975-82d08ae47d0e>

È stato possibile fare domande ai relatori. Chi ha seguito tutti e tre i seminari e ha prodotto una relazione di 4000 caratteri a seminario, ha potuto ottenere 1 CFU.

### **GRAd-COV2 vaccine development: challenges and perspectives**

*12 marzo 2021 – Piattaforma Teams*

Il primo incontro con compagnie biotech organizzato dall'Università di Roma "Tor Vergata" è stato tenuto dalla Dott.ssa Antonella Folgori della ReiThera s.r.l. Oggetto dell'incontro è la descrizione e l'analisi di tutte le fasi di realizzazione del vaccino contro l'infezione da SARS-Cov-2 denominato "GRAd-COV2", interamente sviluppato dalla compagnia ReiThera di Castel Romano. La Dott.ssa Folgori ha delineato le caratteristiche generali dei vaccini e della ricerca tecnologica implicata nel loro sviluppo. Un cenno introduttivo è stato anche fatto riguardo i meccanismi della risposta immunitaria nei confronti delle infezioni virali, che avviene attraverso due modalità: una immunità umorale, grazie ai linfociti B, e una immunità mediata dai linfociti T; per contrastare efficacemente l'infezione è necessario che entrambi questi meccanismi siano attivati.

Sono stati illustrati i vari approcci possibili per sviluppare un nuovo vaccino, ponendo l'attenzione sui vaccini di tipo "genetico" che vengono realizzati con la manipolazione diretta degli acidi nucleici e l'uso di vettori. Con questo approccio i tempi di sviluppo sono notevolmente ridotti e nel caso del SARS-CoV-2 questo aspetto rappresenta un punto cruciale. I vaccini genetici, inoltre, sono in grado di indurre sia risposta umorale che cellulosa-mediata. Introdurre l'acido nucleico di interesse all'interno della cellula ospite però non è un'operazione di facile realizzazione: un metodo efficace è quello di utilizzare un vettore virale opportunamente modificato nel quale sono inserite le sequenze ricombinanti, prodotte attraverso idonee linee cellulari. Con l'inoculazione di un virus ricombinante così costituito si ha sia la presentazione degli antigeni alle cellule T sia l'induzione della produzione di anticorpi.

Un vettore che può essere utilizzato a questo scopo è l'Adenovirus 5, molto ben caratterizzato, facilmente manipolabile e con ampio tropismo cellulare. Purtroppo, essendo un virus umano, la presenza di anticorpi neutralizzanti ne rappresenta un ostacolo all'utilizzo. Questo problema è stato superato utilizzando un vettore di Adenovirus derivato da scimpanzè e gorilla che non ha problemi di immunità preesistente nell'uomo.

Prima di esaminare le caratteristiche del vaccino ideato da ReiThera, la Dott.ssa Folgori ha descritto la struttura del virus SARS-CoV-2, illustrando come la proteina Spike rappresenti il target ideale per sviluppare un vaccino. Tale proteina si trova sulla superficie virale in forma di trimero ed è responsabile della penetrazione nella cellula ospite dell'epitelio respiratorio attraverso la fusione col recettore ACE-2.

Sono stati quindi evidenziati alcuni aspetti chiave del vaccino ReiThera "GRAd-COV2", ponendo in risalto l'utilizzo di un vettore di Adenovirus di gruppo C che ha mostrato possedere bassa sieroprevalenza nell'uomo ma alta capacità immunogenica. Altro aspetto chiave affrontato è quello di come sia stato ingegnerizzato il transgene della proteina Spike per ottimizzare la

produttività e minimizzare l'instabilità genomica. Non meno importante è anche la capacità produttiva potenziale di questo vaccino, quantificata in 200 milioni di dosi per anno.

Nella successiva parte della presentazione è stato mostrato lo stato attuale dello sviluppo del vaccino (studi clinici di fase II/III) e i risultati ottenuti nella sperimentazione animale. Inizialmente è stata valutata l'efficacia nei topi, rilevando nel siero i livelli di anticorpi prodotti nei confronti della proteina Spike (e del receptor binding domain) a distanza di 2 e 5 settimane dall'inoculazione; in entrambi i casi è stato rilevato un alto titolo anticorpale. È stata inoltre studiata la risposta cellulomediata a 5 settimane di distanza con una forte immunizzazione prodotta dalle cellule T-helper. Vengono quindi mostrati i dati ottenuti dalla sperimentazione del vaccino effettuata sui primati (macaco), in particolare è stata confrontata l'efficacia del GRAd-COV2 in singola somministrazione con il vaccino Janssen e in doppia somministrazione con il vaccino Moderna: i titoli anticorpali rilevati dopo somministrazione con GRAd-COV2 sono sovrapponibili agli altri vaccini testati. Più in particolare è stata effettuata la misurazione della risposta umorale nel macaco a 2, 4, 6 e 10 settimane di distanza, risultante in un'alta immunizzazione già a 2 settimane di distanza che tuttavia persiste anche dopo 10 settimane.

Infine, è stata illustrata la metodologia prevista per lo studio clinico sull'uomo e i risultati (preliminari) ottenuti. Lo studio prevede una popolazione di 90 volontari sieronegativi per SARS-CoV-2 suddivisi in due classi di età rispettivamente di 18-55 e 65-85 anni ulteriormente suddivise in singole classi di 15 individui per le quali sono state somministrate dosi di vaccino in quantità bassa, media ed elevata. Ad oggi è stata completata la vaccinazione di tutti i volontari, e sono state effettuate le visite di controllo a 12 settimane. La conclusione di questa fase (controllo a 6 mesi) è prevista nel prossimo mese di maggio. Le prime evidenze sono incoraggianti, mostrando da un lato un'ottima tollerabilità del vaccino per ogni fascia d'età e quantità di dose somministrata, mostrando solo lievi sintomi successivi alla vaccinazione, dall'altra si ha una forte risposta immunitaria evidenziata da sierconversione dopo 2 settimane con picco a 4 settimane unita ad una risposta delle cellule T valutata con l'aumento della secrezione di INF-gamma. L'attività neutralizzante nei confronti del SARS-CoV-2 è stata rilevata dopo singola somministrazione del vaccino.

L'ultima parte dell'incontro è stata dedicata a quali sono in generale le problematiche nella realizzazione di un vaccino e le modalità con le quali ReiThera sta affrontando questa sfida. La diffusione del virus SARS-CoV-2 ha imposto la creazione di un vaccino "in un decimo del tempo per produrre dosi 1000 volte superiori". Generalmente il tempo impiegato per realizzare un vaccino supera i 10 anni, ma, vista l'emergenza dettata dall'attuale pandemia, si è pensato di sovrapporre le varie fasi di ideazione, realizzazione, test e produzione del vaccino. Tale approccio ha portato all'approvazione dei primi due vaccini (Pfizer-BioNtech e Moderna) in soli 11 mesi. Questo ha portato inoltre alla sperimentazione di nuove tecnologie che potranno essere utilizzate in futuro.

La produzione del vaccino rappresenta un momento estremamente delicato dall'amplificazione e purificazione del vettore sino alla finalizzazione della soluzione iniettabile, a tal fine sono stati mostrati alcuni dei passaggi produttivi oltre ad una panoramica degli strumenti utilizzati presso gli stabilimenti di ReiThera (bioreattori, camere aseptiche). Oltre alla complessità tecnica nella fase realizzativa sono stati anche sottolineati i problemi concernenti i finanziamenti e gli aspetti burocratici che purtroppo rallentano la ricerca in Italia.

Vista l'attuale diffusione di nuove varianti virali si è fatto cenno a come l'emergere di queste varianti abbia un impatto rilevante sia epidemiologico che sull'eventuale riduzione dell'efficacia dei vaccini disponibili.

Il seminario si è concluso con un question-time nel quale la Dott.ssa Folgori ha chiarito e approfondito alcuni tra i temi affrontati.

### **Takis biotech: an overview of the company**

25 marzo 2021 – Piattaforma Teams

Oggetto del seminario, organizzato dall'Università degli Studi di Roma "Tor Vergata" è la presentazione della compagnia "Takis", facente parte del tecnopolo di Castel Romano. Relatore dell'incontro è Mariano Maffei, ex studente dell'Università Tor Vergata e attuale Senior Scientist di Takis.

Takis nasce nel 2009, da una collaborazione di professionisti provenienti da altre due aziende IRBM e MSD ponendosi come obiettivo quello di sviluppare nuovi strumenti e tecniche in diversi campi della ricerca, in particolare nella diagnostica e nella terapia oncologica (attraverso lo studio di nuovi marcatori biologici e lo sviluppo di vaccini contro il cancro) e in altri campi come la sintesi e produzione di anticorpi nella terapia per le malattie rare.

L'azienda essenzialmente svolge la propria attività in due divisioni: TakisBiotech e TakisServices; la divisione Biotech si occupa prevalentemente di ricerca, soprattutto nel campo oncologico, mentre TakisServices mette a disposizione le conoscenze maturate e le capacità produttive ad enti terzi, sia pubblici che privati. Takis in poco più di 10 anni ha visto aumentare in modo esponenziale il numero dei propri dipendenti con un progressivo aumento di collaborazioni sia in ambito accademico che industriale. Tale crescita ha contribuito a dare vita a due "spin-off": EvviVax, nata nel 2016, focalizzata nell'immunoterapia per le patologie oncologiche in ambito veterinario e NeoMatrix, specializzata nella terapia personalizzata contro il cancro.

Il Dott. Maffei ha quindi illustrato la tecnica DNA-EGT (Electro-Gene-Transfer) per la quale Takis è all'avanguardia; tale metodica prevede l'induzione nel paziente di brevi impulsi elettrici che provocano transienti formazioni di pori nelle membrane cellulari in grado di permettere il passaggio di grandi molecole come DNA e RNA (codificanti ad esempio antigeni tumorali). Il gradiente elettrico che si viene a formare all'interno della cellula permette la penetrazione del DNA esogeno nel nucleo. All'aumentata espressione genica consegue un incremento della risposta immunitaria sia attraverso la secrezione di citochine che con l'arruolamento di cellule APC nel sito di trasferimento genico portando ad una risposta sia umorale che cellulo-mediata notevolmente superiore a quella riscontrata con una semplice iniezione intramuscolare di DNA. Le applicazioni del DNA-EGT sono numerose, in particolare Takis sta sviluppando vaccini oncologici e anticorpi monoclonali attualmente in fase preclinica.

Altro campo nel quale Takis sta contribuendo in modo significativo è quello dello sviluppo di un vaccino contro il virus SARS-CoV-2, denominato "Covid-eVax". Si tratta del primo vaccino a DNA sviluppato in Europa, somministrato tramite elettroporazione. Attualmente in fase preclinica, questo vaccino si è dimostrato paragonabile agli altri vaccini disponibili, con il grande vantaggio di essere più facilmente manipolabile, non necessitando della catena del freddo indispensabile nel trasporto dei vaccini a RNA. Questa caratteristica potrebbe offrire la disponibilità di vaccini anche ai Paesi meno avanzati che non possono garantire un'adeguata distribuzione dei vaccini a RNA. Maffei ha tuttavia precisato che al momento Takis non è in grado di garantire una produzione su larga scala, essendo una società di livello "medio". Takis può comunque avvalersi di compagnie esterne per la produzione, mettendo a disposizione le proprie competenze.

Prima di passare alla seconda parte del seminario vengono sinteticamente riassunti i servizi prestati da Takis, in particolare la PPF (Protein Production Facility) che ha un ruolo sia "interno" ovvero come strumento di ricerca attualmente coinvolto in molti progetti, sia "esterno" mettendo a disposizione dei vari clients la possibilità di sintetizzare e purificare proteine attraverso *E. Coli* e cellule di insetti. Takis fa anche parte del P4EU (Protein Production and Purification Partnership in Europe) per condividere e migliorare le conoscenze in ambito proteico.

Il Dott. Maffei ha brevemente illustrato il suo percorso professionale, offrendo numerosi suggerimenti agli studenti presenti all'incontro. Maffei si è laureato nel 2010, trasferendosi poi a Barcellona per il Dottorato di Ricerca, al termine del quale trascorre 4 anni per il "Post-doc" all'EMBL. Dal 2019 lavora presso Takis. Nella sua carriera, sia accademica che professionale, ha sempre rilevato come sia di fondamentale importanza il "networking", ovvero la collaborazione e il reciproco scambio di esperienze, sia nel percorso di studi che in quello lavorativo. Molti sono stati gli interventi da parte dei partecipanti, con domande riguardanti soprattutto il delicato passaggio al mondo del lavoro. Maffei ha sottolineato più volte come sia importante essere determinati in ciò che si fa, non perdere mai la passione e non rinunciare al confronto. Ha riferito anche come in diversi colloqui di lavoro a cui ha sottoposto giovani neolaureati ha sempre trovato persone preparate e qualificate (compatibilmente con le poche esperienze maturate), ma spesso impreparate a sostenere il colloquio stesso, sollecitando quindi anche una crescita caratteriale e personale oltre che universitaria.

Un ultimo aspetto di interesse riguarda proprio le esperienze personali di Maffei il quale racconta di essere stato positivamente sorpreso di come non esistano enormi differenze tra mondo accademico ed industriale, trovando molti punti di contatto tra le due realtà. A titolo di esempio è stato fatto notare come la pressione di portare avanti un progetto durante il Dottorato è assolutamente sovrapponibile all'impegno necessario per rispettare i termini di consegna di un contratto di produzione. Anche le metodologie utilizzate dalle companies coinvolte nella ricerca hanno spesso un approccio "accademico". Esistono tuttavia dei temi aperti come quello relativo ai brevetti e la diversa titolarità in ambito universitario e aziendale.

Il Dott. Maffei ha concluso il seminario ringraziando i partecipanti, esortando ancora una volta alla collaborazione e al lavoro di gruppo, elementi alla base di una migliore e più rapida crescita sia personale che dell'intera collettività.

### **Development of antibodies against colon cancer stem cells**

16 aprile 2021 – Piattaforma Teams

Il relatore del seminario è il Dott. Christian Steinkhuler, attuale CSO (Chief Scientific Officer) della compagnia Exiris, specializzata negli studi preclinici in campo oncologico.

Nella prima parte della presentazione vengono introdotti i concetti di base riguardanti la ricerca di possibili terapie contro il cancro, in particolare nello sviluppo di anticorpi selettivi contro le cellule staminali tumorali. Ad oggi le terapie mirate in campo oncologico hanno portato a risultati parziali: gli studi di genomica hanno rivelato come molte forme tumorali siano causate da mutazione o sovraespressione di uno o più geni, conseguentemente sono stati concepiti farmaci che possano agire selettivamente sulle cellule che mostrano tali variazioni. Tuttavia frequentemente la risposta ai trattamenti è solo transitoria, a titolo esemplificativo viene mostrato il caso del melanoma, con una remissione a distanza di 15 settimane dall'inizio della terapia e una recidiva dopo 23 settimane.

Il problema di fondo è rappresentato dall'eterogeneità del tessuto tumorale, si ipotizza che una cellula staminale tumorale (CSC cancer stem cell) sia in grado di replicare in progenie indifferenziata che a sua volta genera una serie di cellule più differenziate. Nel momento in cui viene utilizzata una terapia "aspecifica" andando ad eliminare la quasi totalità delle cellule tumorali, si avrà comunque una ripresa della malattia qualora la CSC riprenda la proliferazione cellulare. Inoltre non tutti i tumori solidi si comportano allo stesso modo, nel melanoma infatti ogni cellula tumorale ha potenziale oncogenico, mentre in altre neoplasie come il cancro del colon, il glioblastoma, il carcinoma mammario e le leucemie, solo alcune classi cellulari (composte appunto da CSC) sono in grado di far progredire il tumore avendo elevata capacità differenziativa.

Si è visto come i tumori che possiedono cellule con proprietà staminali siano associati a fenomeni quali la transizione epitelio-mesenchimale (indifferenziazione), che successivamente porta a maggiore invasività, farmacoresistenza, evasione immunitaria e metastatizzazione. Dato che una qualsiasi cellula tumorale potrebbe indifferenziarsi acquisendo caratteristiche “staminali” l’approccio terapeutico ottimale è quello di associare il trattamento chemioterapico alla selettiva eliminazione della CSC.

La strategia di Exiris in questo campo è quella di costruire una “piattaforma” (CSC-platform) funzionale alla ricerca di nuovi antigeni tumorali e alla conseguente costituzione di una libreria di anticorpi umani finalizzata alla realizzazione di farmaci mirati.

Per sviluppare la CSC-platform Exiris si è avvalsa della collaborazione con l’Istituto Superiore di Sanità, utilizzando numerose CSC di neoplasie di colon e polmone. La ricerca di quale caratteristica porti all’acquisizione di “staminalità” nella cellula tumorale è estremamente complessa, in quanto vanno esaminate varie categorie di cellule tumorali e successivamente confrontate con metodi bioinformatici le espressioni geniche di ognuna. Nel caso del cancro del colon si è partiti da quasi 30.000 potenziali target, ridotti dopo numerosi passaggi a 5 finalisti sottoposti a validazione sperimentale. È emerso che la proteina di membrana FGFR4 è presente in quantità elevate nelle cellule tumorali che hanno un comportamento estremamente aggressivo caratterizzato da alta proliferazione e aumentata invasività. Si è riscontrato inoltre che gli anticorpi diretti contro FGFR4 sono efficaci nella riduzione del tessuto neoplastico.

La FGF è una complessa famiglia di cui fanno parte 4 recettori tra i quali FGFR4 che, a differenza degli altri, raramente è mutato nei tumori umani. Fisiologicamente FGFR4 è implicato nel controllo della sintesi degli acidi biliari, mentre in associazione con FGF19 ha un ruolo patologico essendo in grado di attivare vie metaboliche che portano all’attivazione di oncogeni. FGF19 è tra i geni maggiormente amplificati in varie neoplasie. Esperimenti in vitro hanno mostrato come l’anticorpo 3B6 sia in grado di ridurre fortemente la trasmissione del segnale di FGFR4 in quanto legandosi al recettore muta radicalmente la conformazione del recettore stesso. 3B6 si è dimostrato efficace anche nella sperimentazione animale, risultando attivo contro il cancro del colon con metastasi epatiche indotto nelle cavie.

Il passo successivo è stato quindi quello di implementare la piattaforma CSC per sviluppare anticorpi monoclonali umani e costruire quindi una libreria (attraverso phage display) che soddisfi diversi requisiti: l’anticorpo ideale dovrebbe infatti avere alta affinità ed essere anche facilmente manipolabile. Anche questa è una fase molto complessa in quanto per realizzare anticorpi bispecifici vanno selezionate subunità che abbiano forte affinità con recettori cellulari di superficie e subunità in grado di legare bersagli extracellulari. Durante la composizione della libreria si rischia inoltre di perdere i candidati migliori, per ovviare questo problema è stata effettuata una selezione con tecnica NGS dei soli anticorpi H-CDR3 (la regione maggiormente responsabile della variabilità anticorpale) in modo da poter identificare e recuperare anche i cloni meno abbondanti.

Lo step finale nella realizzazione del trattamento è stato quello di creare un coniugato ADC, ovvero di legare all’anticorpo monoclonale una tossina in grado di poter agire solo sul sito di interesse. Questa è una tecnologia riconosciuta e approvata già per 9 farmaci e in corso di verifica per circa un centinaio. Per identificare il farmaco più adatto a questo scopo Exiris ha preso in considerazione 19 composti, tra i quali è stata selezionata la criptoficina, una molecola con proprietà citotossiche e antiproliferative che ha efficacia a dosi picomolari ed è sintetizzabile industrialmente. La criptoficina si è dimostrata efficace nei confronti delle CSC in vitro. Purtroppo lo sviluppo dell’ADC con criptoficina è stato interrotto per via di fenomeni aggregativi avvenuti durante la fase di coniugazione, compromettendone l’utilizzabilità. Sono state tentate altre strade per coniugare la criptoficina ma il prodotto non è risultato efficace nei test *in vivo*.

Tale interruzione nella linea di sviluppo ha portato Exiris ad esplorare altre vie per proseguire nel progetto: è stato preso in considerazione un composto alternativo alla criptoficina (attualmente in fase di studio), sono stati intrapresi contatti con compagnie esterne per collaborare sulla produzione di un ADC non proprietario e in ultima ipotesi si sta valutando lo sviluppo di un anticorpo “nudo” non coniugato.

Il Dottor Steinkhuler ha concluso l'intervento offrendo una panoramica sull'azienda Exiris. È stato sottolineato quanto sia difficile trovare fondi per la ricerca scientifica in Europa e in particolare in Italia. Inizialmente la società ha potuto contare sulla collaborazione con l'ISS che ha messo a disposizione laboratori e attrezzature permettendo l'avvio di progetti che hanno portato all'ottenimento di brevetti e collaborazioni in campo internazionale. Nel 2014 è iniziata inoltre una importante partnership con Italfarmaco. La compagnia è attualmente composta da 3 figure amministrative e 9 posizioni di tipo scientifico. Il budget annuale disponibile è di circa 1.000.000 di €, finanziato in maniera approssimativa per un terzo da fondi pubblici e il restante da privati. La strategia a lungo termine di Exiris è quella di proseguire gli studi in ambito preclinico, sviluppando piattaforme tecnologiche successivamente fruibili da terzi.

**22 aprile 2021 - 17.00-19.00: “Carriere nel farmaceutico: percorsi ed esperienze reali di giovani professionisti”, a cura del Gruppo SIMeF (Società Italiana di Medicina Farmaceutica (sezione giovani)).**

L'evento, organizzato sulla piattaforma Microsoft Teams al seguente link: <https://teams.microsoft.com/l/team/19%3ad7eb92d189904ce2afa766a93005dfde%40thread.tacv2/conversations?groupId=a8f9a288-e3af-448c-b8dc-70382791d0b3&tenantId=24c5be2a-d764-40c5-9975-82d08ae47d0e>, è stato diviso in 3 sessioni ciascuna delle quali ha messo in evidenza alcuni ruoli chiave nella carriera del farmaceutico:

Introduzione Prof. Andrea Battistoni e Prof. Maurizio Fraziano

- Sessione 1: ClinOps e Coordinamento Ricerca Clinica;  
Clinical Research Associate (Mario Fazzi D'Orsi);  
Study Coordinator (Rossella Troia)
- Sessione 2: Qualità e Farmacovigilanza  
Panoramica dei Ruoli in Quality Assurance (Stefano Stabile)  
Farmacovigilance Officer (Marco Colombati)
- Sessione 3: Market Access e Medical Affairs  
Medical Science Liaison - Clinical Trial Liaison (Eros Fabrizi)  
Medical Writer (Marisa Le Donne)  
Market Access & Health Economics (Claudia Condorelli)

I relatori hanno parlato degli studi intrapresi, della loro esperienza di lavoro e del loro ruolo, specificando i pro e i contro del loro impiego. Hanno dato consigli su come muoversi in questo ambito e su quali scuole di perfezionamento intraprendere per ottenere un curriculum adatto all'ingresso nel mondo farmaceutico. Ha tirato le conclusioni il prof. Giovan Battista Leproux) e i moderatori sono stati Valeria Caposotto e Salvatore Spina. Gli studenti hanno poi rivolto domande ai relatori.