

REPORT
Scientifico
2019



REPORT Scientifico 2019

SOCI FONDATORI



PARTNER



A MEDITERRANEAN
HUB FOR TRANSLATIONAL
RESEARCH



Alessandro Padova
DIRETTORE GENERALE

La Fondazione Ri.MED ha chiuso con successo il 2019 completando tutti i passaggi formali per la costruzione del **Centro per le Biotecnologie e la Ricerca Biomedica**, grazie ad un team dedicato alla gestione degli aspetti tecnici, amministrativi e legali e grazie al supporto strumentale dei partner italiani - Presidenza del Consiglio dei Ministri, Regione Siciliana e CNR - ed al supporto direzionale dei partner statunitensi UPMC e University of Pittsburgh.

Nel corso del 2019 sono stati messi a segno importanti risultati utili al raggiungimento delle mission proprie di Ri.MED. In termini di **ricerca traslazionale**, nel corso dell'anno sono stati firmati 19 nuovi accordi di ricerca a livello regionale, nazionale e internazionale. Il portfolio è stato consolidato grazie ad alcuni progetti che stanno entrando nella fase di *drug discovery* ed altri che si spostano verso la *proof-of-concept* preclinica.

È importante sottolineare l'importanza dei **finanziamenti per la ricerca** concessi dalla Regione Siciliana nel corso dell'anno per i progetti *Chemist* e *Infrastrutture di Ricerca*, nonché per le spese operative del Cluster ISMETT-Ri.MED. Nel 2019 sono stati presentati alle istituzioni locali i risultati del progetto Chemist, sia in termini di dotazione tecnologica che di impatto sull'occupazione, nell'ottica di contribuire sinergicamente alla crescita e al benessere del Territorio. Voglio inoltre sottolineare il proficuo sforzo da parte dei team scientifici, guidati dall'ufficio Grant, che hanno lavorato duramente per sottoporre nuove richieste di sovvenzione a valere su bandi regionali, ministeriali ed europei. Per citare un esempio di successo, il progetto OBIND è risultato primo nella graduatoria dei PO FERS Sicilia, aggiudicandosi il finanziamento alla ricerca, insieme ad altri 3 progetti presentati da Ri.MED.

Le **piattaforme tecnologiche** e le aree di ricerca sono state consolidate e rese produttive con il supporto continuo dell'ufficio Acquisti e parallelamente sono state inserite nuove **risorse in organico**, mentre per i profili già presenti sono stati organizzati **programmi di formazione** specifici, che hanno coperto competenze chiave come la *leadership*, ma anche argomenti specifici come la *proprietà intellettuale*.

Vorrei ringraziare il Direttore Scientifico Dario Vignali e il Comitato Scientifico per la costante leadership nello sviluppo di una visione per la ricerca traslazionale di Ri.MED. Un ringraziamento speciale al Consiglio di Amministrazione, in particolare al nostro Presidente Paolo Aquilanti e al Vicepresidente Bruno Gridelli, che hanno lavorato duramente, dietro le quinte, per garantire a Ri.MED tutto il supporto necessario da parte dei fondatori e delle istituzioni pertinenti.



Dario Vignali
DIRETTORE SCIENTIFICO

Benvenuti all'edizione 2019 del nostro annuale Report Scientifico, che offre una panoramica dei team Ri.MED, dei progetti di ricerca, delle competenze e delle tecnologie disponibili, elementi chiave delle nostre mission: tradurre la ricerca biomedica e biotecnologica in terapie innovative per i pazienti e facilitare la formazione della nuova generazione di scienziati biomedici italiani.

La ricerca Ri.MED si concentra su tre aree terapeutiche: il **cancro**, con particolare attenzione all'immunoterapia, l'**insufficienza d'organo**, che comprende il trapianto di organi e la medicina rigenerativa, e le **malattie dell'invecchiamento**, con particolare attenzione alla neurodegenerazione.

Nel 2019, grazie all'impegno e allo sforzo del nostro Comitato scientifico composto dai Prof.ri Francesco Dieli, Ivet Bahar, George Fadi Lakkis, Claudio Bordignon e Antonino Cattaneo, abbiamo effettuato un'ampia **revisione scientifica di tutti i programmi di ricerca** condotti in Ri.MED. In secondo luogo, **abbiamo istituito un nuovo programma Ri.MED di borse di studio post-dottorato** e completato il primo round di reclutamento, assegnando tre borse di studio.

L'edizione 2019 del nostro **Simposio Scientifico "Organ Insufficiency: change it or fix it"** è stata organizzata grazie al coordinamento scientifico dei Prof.ri Fadi Lakkis e Riccardo Gottardi. L'evento, svoltosi a Palermo, ha riunito un gruppo di esperti a livello internazionale ed ha riscosso un notevole successo di pubblico, confermando il ruolo che Ri.MED può e intende svolgere sul territorio e nella comunità scientifica internazionale.

In concomitanza con il Simposio si è svolta la **seconda edizione del Ri.MED Research Retreat**, che ha visto la presentazione dei 9 team di ricerca, 2 *poster session* ed un'attività di *team building*. Il Retreat si è rivelato un evento scientifico ed aggregativo davvero utile, che ha permesso a tutti i ricercatori Ri.MED di condividere i propri risultati ed esplorare nuove collaborazioni scientifiche.

Uno dei principali obiettivi del Comitato scientifico per il 2020 sarà lo sviluppo di un **piano strategico di ricerca in linea con il percorso di ormai prossima realizzazione del Centro per le Biotecnologie e la Ricerca Biomedica** in Sicilia.

L'impegno per l'eccellenza e la crescita dei nostri ricercatori, l'ambiente internazionale e multidisciplinare e la ricca rete di collaborazioni sono ciò che mi rende orgoglioso di far parte di Ri.MED e della sua mission.

INDICE

Ri.MED OVERVIEW 8

Formazione	10
Diffusione del sapere scientifico	12
Networking	14
CBRB	16
Public engagement	18

GRUPPI DI RICERCA 20

SUPPORTED SCIENTISTS 24

SVILUPPO DI NUOVI FARMACI 26

Meccanismi molecolari delle malattie da <i>misfolding</i> proteico Caterina Alfano, PhD	28
Modalità di legame di molecole in grado di interferire con il processo di oligomerizzazione di NPM1 Caterina Alfano, PhD	30
Nuovo <i>cross-talk</i> fra le cellule epiteliali ed i macrofagi nella colite ulcerosa e cancro al colon Sandra Cascio, PhD	32
Ruolo dell'inflammasoma NLRP3 e alterazioni immuno-metaboliche nella broncopneumopatia cronica ostruttiva (BPCO) Chiara Cipollina, PhD	34
Sviluppo di algoritmi per modellizzare il <i>network</i> di interazione di microRNA e relativi <i>target</i> Claudia Coronello, PhD	36
Farmacologia dei lipidi nitro-nitrati Marco Fazzari, PhD	38
Progettazione di modulatori di CD14 nella degenerazione della macula correlata a invecchiamento Ugo Perricone, PhD	40
Progettazione di inibitori non covalenti di NLRP3 come potenziali nuovi farmaci antinfiammatori Ugo Perricone, PhD	42
Progettazione di modulatori della Istone lisina demetilasi 4 (KDM4) come agenti antitumorali Ugo Perricone, PhD	44

MEDICINA RIGENERATIVA E IMMUNOTERAPIA 46

Ingegnerizzazione di cellule CAR-NK per la cura del tumore epatico Ester Badami, PhD	48
Cellule Dendritiche regolatorie nella prevenzione del rigetto di organo Ester Badami, PhD	50
Ottimizzazione di approcci di tipo <i>cell-based</i> per il riparo di ferite cutanee croniche: soluzioni di rilascio del secretoma a base di biomateriali Cinzia Chinnici, PhD	52
Immunoterapia contro <i>K. pneumoniae</i> basata su ceppi probiotici <i>S. cerevisiae</i> geneticamente modificati Bruno Douradinha, PhD	54
Sorveglianza e caratterizzazione di ceppi batterici multiresistenti di rilevanza clinica Bruno Douradinha, PhD	56
Rigenerare di un fegato in sedi ectopiche Maria Giovanna Francipane, PhD	58
Rigenerare di un rene in sedi ectopiche Maria Giovanna Francipane, PhD	60
OActive - Modelli computazionali avanzati, personalizzati e multiscala per la prevenzione dell'OsteoArtrosi Riccardo Gottardi, PhD	62
Linfociti T multi-virus specifici per il trattamento delle infezioni virali post trapianto Monica Miele, PhD	64
Studio di cellule mesenchimali stromali da placenta umana per applicazioni in medicina rigenerativa e possibili terapie epatiche Mariangela Pampalone	66
iRhom2: un nuovo target terapeutico in osteoartrosi? Simone Dario Scilabra, PhD	68
iRhom2 regola i livelli delle molecole MHC di classe I e risposte immunitarie Simone Dario Scilabra, PhD	70

INGEGNERIA DEI TESSUTI E DISPOSITIVI BIOMEDICALI 72

Sviluppo di bio-adesivi per ambienti acquosi Caterina Alfano, PhD	74
Sviluppo di una valvola cardiaca transcateretere innovativa Gaetano Burriesci, PhD	76
Sviluppo di una valvola cardiaca in tessuto animale priva di Alfa-Gal Gaetano Burriesci, PhD	78
Analisi dell'appendice atriale sinistra per la predizione del rischio di trombosi Gaetano Burriesci, PhD	80
Analisi idrodinamica della valvola aortica in condizioni ottimali ed alterate Gaetano Burriesci, PhD	82
Caratterizzazione termomeccanica di biomateriali superelastici Ni-Ti Gaetano Burriesci, PhD	84
Bioreattori per l'elaborazione e deposizione di matrice extracellulare (BE-ECM) Antonio D'Amore, PhD	86
Modelli numerici per la meccanica e la crescita tissutale di tessuti nativi ed ingegnerizzati (NET-MTG) Antonio D'Amore, PhD	88
Analisi strutturale ed istopatologica per immagini di tessuti nativi ed ingegnerizzati (NET-IBA) Antonio D'Amore, PhD	90
Parete di miocardio ingegnerizzata (TECP) Antonio D'Amore, PhD	92
Valvole cardiache ingegnerizzate (TEHV) Antonio D'Amore, PhD	95
Vasi sanguigni ingegnerizzati (TEVG) Antonio D'Amore, PhD	98
R-CaRe - Riabilitazione per la rigenerazione della Cartilagine Riccardo Gottardi, PhD	100

PIATTAFORME TECNOLOGICHE 102

Bioinformatica	104
Bioingegneria	106
Biologia strutturale e biofisica	108
Computer Aided Drug Design	110
High-throughput Screening	112
Magnetic Resonance Imaging	114
Proteomica	116
Cell Factory	118

FINANZIAMENTI PER LA RICERCA 120

Progetti in corso di svolgimento	122
Progetti ammessi a finanziamento	123
Progetti sottomessi	124

PROPRIETÀ INTELLETTUALE E TRASFERIMENTO TECNOLOGICO 126

Portfolio brevetti al 31.12.2019	128
----------------------------------	-----



Proprietà intellettuale



circa

300

Publicazioni scientifiche

25

Brevetti depositati

1

Proposta di brevetto

Formazione e occupazione



54 Dipendenti nel 2019

57%

43%



30

Borse di studio

18 University of Pittsburgh

Borse di studio Post Doc presso University of Pittsburgh

14

Borse per Dottorati di Ricerca

21

Tirocini

Finanziamenti per la ricerca



16.849.193€

Vinti attraverso bandi nazionali ed internazionali

8.000.000€

Contributo Regionale per il cluster Ri.MED - ISMETT

Networking



3

Accordi per la gestione diretta di laboratori

48

Accordi di collaborazione scientifica in essere nel 2019

19

Accordi di collaborazione scientifica stipulati nel 2019

Diffusione del sapere scientifico



37

Meeting scientifici Ri.MED

7 Eventi interni Ri.MED

30

Partecipazioni ad eventi di settore

9 Eventi istituzionali Ri.MED

Il progetto CBRB



28.000 mq
di laboratori

196.350.000€
il valore dell'investimento



600

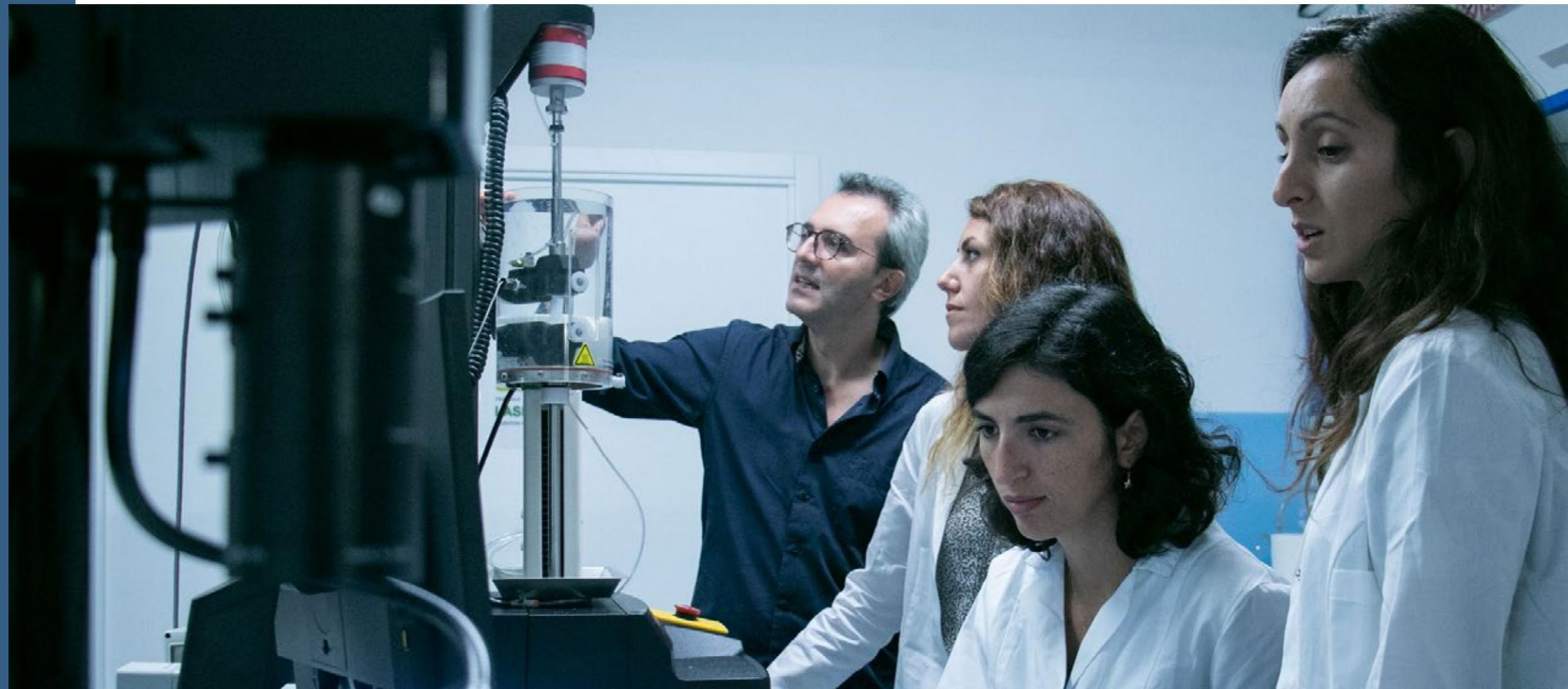
Posti di lavoro previsti

FORMAZIONE

Coltivare talenti

Ri.MED dedica grande impegno alla formazione di personale altamente qualificato, riconoscendone il ruolo decisivo per il successo delle sfide scientifiche e per lo sviluppo della competitività di tutto il territorio.

Ad oggi Ri.MED ha attivato numerose opportunità formative, tra cui 21 tirocini, 30 borse di studio, 14 PhD e 18 Post-Doc fellowship: un trend in continuo aumento e destinato a progredire ulteriormente in vista della realizzazione del CBRB.



Alcuni di questi programmi sono resi possibili grazie alla **partnership con l'Università di Pittsburgh**, che ha già ospitato 18 post-doc nell'ambito della **Fellowship Ri.MED**.

Nel corso del 2019 sono stati selezionati altri 3 brillanti ricercatori, che partiranno alla volta di Pittsburgh e Filadelfia nel 2020.

Numerosi **programmi di training** sono stati attivati nell'ambito di finanziamenti ottenuti su bandi europei, ministeriali e regionali: grazie

al co-finanziamento di progetti scientifici, nel corso del 2019 sono state formate decine di figure molto qualificate.

Lo scorso autunno Ri.MED ha inoltre ottenuto da FonARCom l'approvazione del **Piano formativo "Innovation and Development"** per l'erogazione di corsi di formazione aziendale per i propri dipendenti.

VALORIZZAZIONE E DIFFUSIONE DEL SAPERE SCIENTIFICO

Le attività legate alla divulgazione scientifica e alla condivisione dei risultati della ricerca fanno parte delle mission proprie della Fondazione.

L'edizione 2019 dell'annuale Simposio Scientifico ha riscosso grande interesse. Co-chair del convegno sono stati il Prof. Lakkis del Comitato scientifico Ri.MED, nonché Direttore scientifico dell'Istituto Trapianti "Starzl" della University of Pittsburgh School of Medicine, e il Prof. Gottardi, Principal Investigator Ri.MED e Direttore del Bioengineering and Biomaterials Laboratory del Children's Hospital of Philadelphia.



A loro il merito di aver saputo riunire a Palermo i massimi esperti a livello internazionale sul tema "Organ Insufficiency: change it or fix it".

Nel corso del 2019 la Fondazione ha ospitato il meeting di **Oactive - Programma Horizon 2020** - di cui Ri.MED è partner insieme ad altri 12 enti europei, progetto focalizzato sulla diagnosi precoce e lo sviluppo di approcci riabilitativi per prevenire l'osteoartrite.

Nel frattempo i nostri ricercatori continuano a pubblicare articoli scientifici su **peer review journal** con rilevante impact factor, contribuendo alla divulgazione scientifica di settore, oltre che alla generazione di proprietà intellettuale, mentre l'ufficio stampa opera per trasferire i principali tra questi risultati ad un pubblico più vasto di non addetti ai lavori.

NETWORKING

Obiettivo delle collaborazioni è integrare competenze complementari a progetti di ricerca traslazionale congiunti, aumentandone la massa critica e le potenzialità di successo. Fondamentale è la capacità di creare network in grado di competere al finanziamento delle linee di ricerca.

Per questa ragione Ri.MED dedica grande attenzione al continuo sviluppo della propria rete di collaborazioni e convenzioni scientifiche con enti ed istituzioni di settore: ad oggi sono operativi 48 accordi per lo sviluppo dell'innovazione tecnologica, la promozione dell'attività di ricerca e la condivisione di laboratori e risorse con enti europei e statunitensi. Di questi, ben 19 sono stati stipulati nel corso del 2019.

Ri.MED ha inoltre concordato la gestione diretta di laboratori situati all'interno di alcuni enti con cui ha siglato accordi di collaborazione: è già operativa da anni la gestione dei laboratori di Medicina Rigenerativa e Immunologia presso l'IRCCS-ISMETT, di importanza strategica per l'integrazione della ricerca di base con quella clinica; il 2019 ha visto inoltre il forte potenziamento dei laboratori di Biologia Strutturale e Biofisica presso l'ATeN Center, di Bioingegneria e Dispositivi Medici presso l'Università degli Studi di Palermo e di High Throughput Screening presso l'IRIB del CNR.

UPMC - University of Pittsburgh Medical Center

UPMC School of Medicine

University of Pittsburgh:

Department of Surgery and Bioengineering,
Department of Orthopaedic Surgery,
Department of Medicine, Division of Cardiology
Department of Pathology
Department of Pharmacology and Chemical Biology
Department of Immunology

Mc Gowan Institute for Regenerative Medicine

CHOP - Children's Hospital of Philadelphia

FRANCIA

CNRS - Centre National de la Recherche Scientifique

Sorbonne Université

UTC
Université de Technologie de Compiègne

Institut de La Vision

INSERM - Institut National de la Santé Et de la Recherche Médicale

BELGIO

Universiteit Antwerpen

Université de Louvain

GERMANIA

Ludwig - Maximilians-Universität München

DZNE - Deutsches Zentrum für Neurodegenerative Erkrankungen

GRECIA

CERTH - Center for Research & Technology Hellas
University of Patras

REGNO UNITO

Liverpool John Moores University

SPAGNA

Hospital Universitari i Politècnic La Fe

Palermo

Messina

Catania

SICILIA
ITALIA

IRCCS ISMETT

ATeN Center

Fondazione Istituto Giglio di Cefalù

IAMC - CNR

IBF - CNR

IRIB - CNR

Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Sicilia "A. Mirri"

Università degli Studi di Palermo

Università degli Studi di Messina

Università degli Studi di Catania

LNS-INFN

Laboratori Nazionali del Sud dell'Istituto Nazionale di Fisica Nucleare

ITALIA

Milano

Pisa

Chianciano

Roma

Napoli

Palermo

CNR - Consiglio Nazionale delle Ricerche

Università di Pisa - Dipartimento di Farmacia

Aurora-TT - Translating Research into care

Università degli Studi della Campania Luigi Vanvitelli
Dipartimento di Medicina di Precisione

Epi-C Epigenetic Compounds

UPMC Institute for Health - Chianciano Terme

TES PHARMA

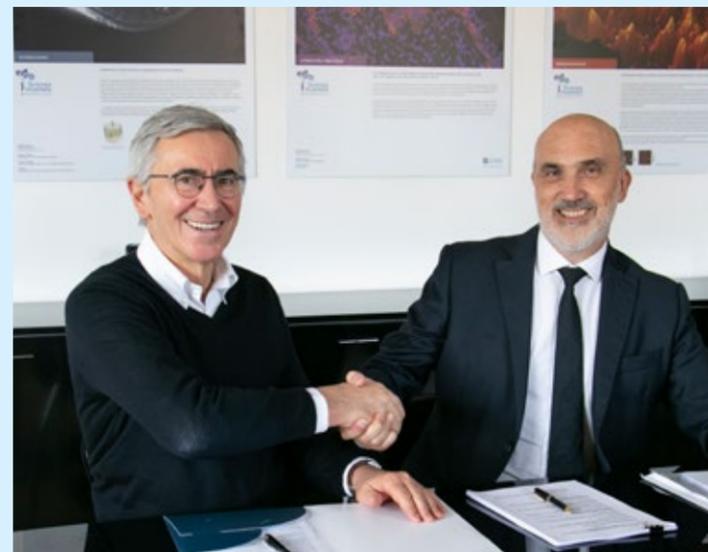
Università degli Studi Roma Tre

CBRB

Generare un impatto socio-economico per la Sicilia e il Sud Italia

Parallelamente all'attività di ricerca, Ri.MED è impegnata nella realizzazione del Centro per le Biotecnologie e la Ricerca Biomedica (CBRB) a Carini, in provincia di Palermo.

Il centro, che ospiterà anche un incubatore d'impresa, rappresenta un modello gestionale di partnership pubblico-privata, capace di dialogare con università ed enti di ricerca da una parte e con aziende farmaceutiche e biotecnologiche dall'altra, per sviluppare alleanze strategiche ed attrarre finanziamenti ed investimenti per la ricerca, con effetti positivi sull'economia del Mezzogiorno.



Nel corso del 2019 è stato firmato il contratto per la costruzione del CBRB con l'ATI aggiudicataria della gara, capitanata da Italiana Costruzioni S.p.A.

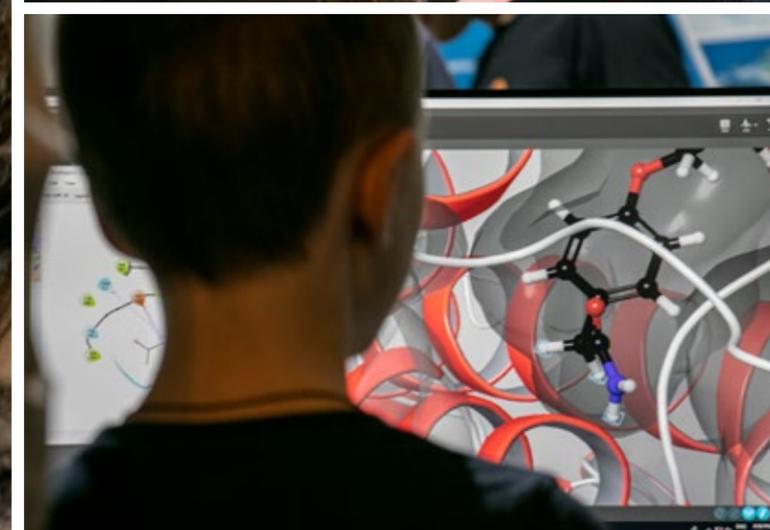
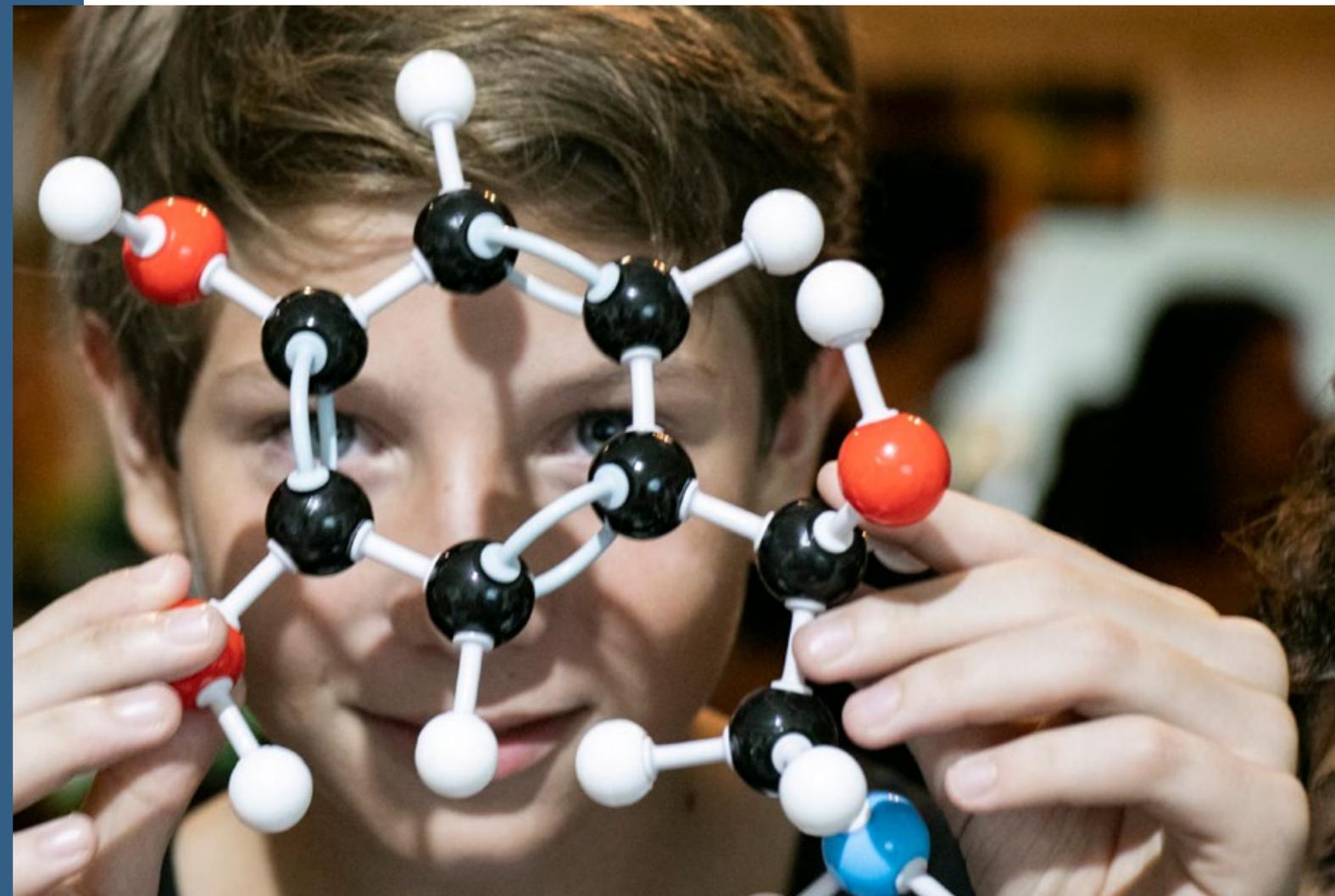
Si chiude così un percorso iniziato con la pubblicazione del concorso internazionale per la progettazione del CBRB, vinto dal raggruppamento di imprese guidato da Hellmuth, Obata & Kassabaum Inc., cui sono seguiti gli iter approvativi dei progetti Preliminare, Definitivo ed Esecutivo e finalmente la pubblicazione del bando di gara

a procedura ristretta per l'affidamento dei lavori di costruzione, conclusosi nel giugno 2019. Il cantiere aprirà nei primi mesi del 2020 e si prevede che i lavori di costruzione termineranno entro due anni.

Il CBRB porterà a Palermo esponenti della comunità scientifica internazionale, trattenendo nel nostro Paese i migliori medici e scienziati italiani, anche grazie alla collaborazione con UPMC e con l'Università di Pittsburgh.

PUBLIC ENGAGEMENT

Coinvolgere ed ispirare un pubblico eterogeneo è una delle nostre priorità, per questo stiamo lavorando ad un programma di **public engagement** per coinvolgere cittadini di tutte le età, in collaborazione con i principali interlocutori del territorio. Il dialogo nella comunità locale deve portare allo sviluppo di attività che agevolino e promuovano la conoscenza, da quella legata alla scienza e alla salute, a quella legata alle opportunità di investimento e impiego, fino a quella legata alla legalità e alla meritocrazia.



Ri.MED intende incrementare via via la propria presenza sul territorio, sviluppando nuovi programmi educativi con le scuole e di coinvolgimento della comunità.

Nel 2019 Ri.MED ha partecipato alla **Notte Europea dei Ricercatori** con l'iniziativa "Dalle molecole al cuore", curato i laboratori "**Research Friday**" di scienze applicate al liceo STEM del CEI di Palermo e portato avanti la collaborazione con l'Istituto Mursia di Carini, nonché avviato un nuovo progetto

con l'Istituto Tecnico Industriale Volta di Palermo, finalizzato alla formazione di tecnici specializzati nell'utilizzo di dispositivi diagnostici e biomedicali.

Grande successo inoltre per la prima edizione di "**Incontra Ri.MED**", un ciclo di 5 seminari informativi di approfondimento su specifici ambiti di ricerca (dai **Big Data** agli ATMPs), pensati per gli studenti universitari, al fine di fornire orientamento sulle attività, le sfide e le opportunità nel mercato del lavoro **Life Science**.



GRUPPI DI RICERCA Ri.MED



GMP CELL FACTORY



Chiara Di Bartolo, MSc
QUALIFIED PERSON
cdibartolo@fondazionerimed.com

Danilo D'Apolito, PhD
Quality Control Manager

Monica Miele, PhD
GMP Production Manager

Mariangela Di Bella
Senior Specialist in Cell Production

Francesca Timoneri, PhD
Scientist in Biomedicine

Salvatore Pasqua
Laboratory Senior Technician

Ri.MED Lab c/o IRCCS ISMETT, Palermo

PRECLINICAL RESEARCH



Valeria Pagano, PhD
HEAD OF ANIMAL WELFARE
vpagano@fondazionerimed.com

Albert Comelli
Scientist in Nuclear Magnetic Resonance

Rossella Alduino
Data Collector - **Ricerca Finalizzata 2013**

Ri.MED Lab c/o Istituto Zooprofilattico, Palermo

REGENERATIVE MEDICINE AND IMMUNOTHERAPY



Giovanna Frazziano, PhD
GROUP COORDINATOR
gfrazziano@fondazionerimed.com

Bruno Douradinha, PhD
Principal Investigator In Vaccine Development

Ester Badami, PhD
Senior Scientist in Immunology

Cinzia Chinnici, PhD
Senior Scientist in Regenerative Medicine

Simona Corrao, PhD
Senior Scientist in Cellular isolation and transplantation

Roberto Di Gesù, PhD
Post Doctoral Researcher - **OActive**

Mariangela Pampalone
Senior Specialist in Cell Biology

Daniele Galvagno
Senior Specialist in Cell Biology

Giandomenico Amico, PhD
Scientist in Biomedicine

Claudia Carcione
Laboratory Technician

Giampiero Vitale
Laboratory Technician

Diego S. Paini
Laboratory Technician

Salvatrice Lo Giudice
Laboratory Support

Ri.MED Lab c/o IRCCS ISMETT, Palermo

PROTEOMICS



Simone Dario Scilabra, PhD
PRINCIPAL INVESTIGATOR IN PROTEOMICS
sdscilabra@fondazionerimed.com

Anna Paola Carreca
Scientist in Proteomics - **CheMIST**

Matteo Calligaris
PhD Student - **iRhom2**

Ri.MED Lab c/o IRCCS ISMETT, Palermo



MOLECULAR INFORMATICS



Computer Aided Drug Design

Ugo Perricone, PhD
SENIOR SCIENTIST IN COMPUTER AIDED DRUG DESIGN
uperricone@fondazionerimed.com

Giada De Simone
Scientist in Molecular Informatics - **CheMIST**

Nedra Mekni
Scientist in Computational Chemistry - **CheMIST**

Jessica Lombino
PhD Student in Molecular and Biomolecular Sciences

Maria Rita Gulotta
PhD Student in Molecular and Biomolecular Sciences - **CheMIST**

Serena Vittorio
PhD Student in Applied Biology and Experimental

Isabella Mendolia
PhD Student in Engineering of Technological Innovation

Ornella Randazzo
PhD Student in Molecular and Biomolecular Sciences

Salvatore Contino
PhD Student in Engineering of Technological Innovation

Camilla Pecoraro
PhD Student in Molecular and Biomolecular Sciences

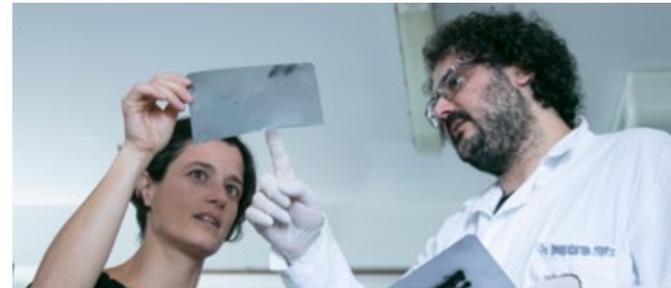


Bioinformatics and Data Analysis

Claudia Coronello, PhD
SENIOR SCIENTIST IN COMPUTATIONAL BIOLOGY
ccoronello@fondazionerimed.com

Giorgio Bertolazzi
PhD Student in Statistical and Economic Sciences

Ri.MED Headquarter, Palermo



IDENTIFICATION OF THERAPEUTIC TARGETS AND SCREENING

Inflammatory diseases



Chiara Cipollina, PhD
PRINCIPAL INVESTIGATOR
IN ANTI-INFLAMMATORY DRUGS
ccipollina@fondazionerimed.com

Mario Fogazza, PhD
Junior Scientist in High Throughput Screening

Francesco Patanè, PhD
Junior Scientist in High Throughput Screening

Marco Buscetta, PhD
Laboratory Technician

Giovanni Zito, PhD
Post Doctoral Researcher in Imaging

Ri.MED Lab c/o IBIM CNR, Palermo



Medical Chemistry

Maria De Rosa, PhD
PRINCIPAL INVESTIGATOR IN MEDICAL CHEMISTRY
mdrosa@fondazionerimed.com

Ri.MED Headquarter, Palermo



STRUCTURAL BIOLOGY AND BIOPHYSICS



Caterina Alfano, PhD
GROUP LEADER IN STRUCTURAL BIOLOGY
calfano@fondazionerimed.com

Maria Agnese Morando, PhD
Post Doctoral Researcher in Structural Biology and Biophysics - **CheMIST**

Rosario Vallone, PhD
Post Doctoral Researcher in Structural Biology and Biophysics - **CheMIST**

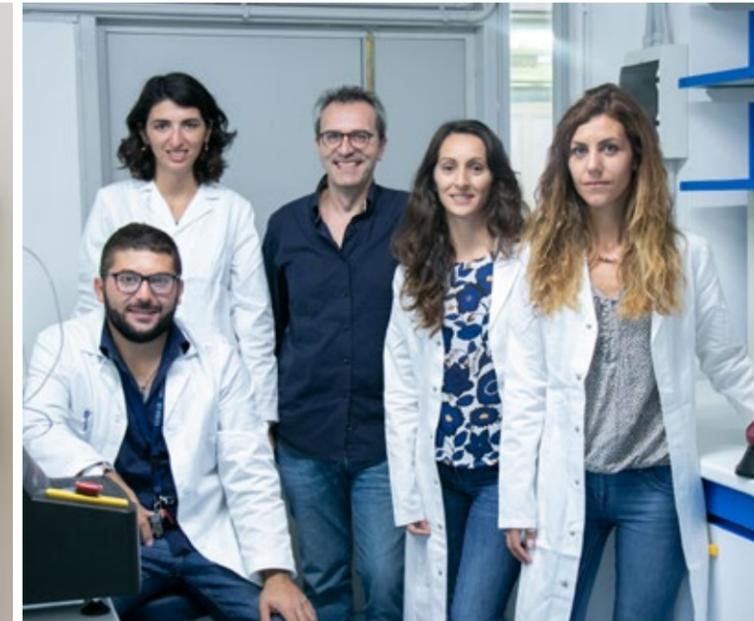
Raffaele Sabbatella
Structural Biology Laboratory Technician - **CheMIST**

Elisa Monaca
Structural Biology Laboratory Technician

Francesca Venturella
PhD Student in Technologies and Health Sciences for Man - **CheMIST**

Anna Fricano
PhD Student in Biotechnology and Molecular Medicine

Ri.MED Lab c/o ATeN Center, Palermo



COMPUTATIONAL AND EXPERIMENTAL BIOENGINEERING



Gaetano Burriesci, PhD
GROUP LEADER IN BIOENGINEERING
gburriesci@fondazionerimed.com

Salvatore Pasta, PhD
Principal Investigator in Computational Bioengineering

Danila Vella, PhD
Post Doctoral Researcher in Computational Bioengineering - **CheMIST**

Alessandra Monteleone, PhD
Post Doctoral Researcher in Computational Bioengineering - **CheMIST**

Sofia Di Leonardo
PhD student in Engineering of Technological Innovation - **CheMIST**

Giulio Musotto
PhD student in Engineering of Technological Innovation

Marzio Di Giuseppe
PhD student in Technologies and Health Sciences

Federica Cosentino
PhD student in Technologies and Health Sciences - **CheMIST**

Ri.MED Lab c/o Università di Palermo



Ri.MED SUPPORTED SCIENTIST



Courtesy of Giuseppe Peritore



Riccardo Gottardi, PhD
ASSISTANT PROFESSOR,
Bioengineering and Biomaterials
Laboratory, Children's Hospital of
Philadelphia, Dept. of Pediatrics,
Perelman School of Medicine
Dept. of Bioengineering, School of
Engineering and Applied Sciences,
University of Pennsylvania, USA
rgottardi@fondazionerimed.com



Sandra Cascio, PhD
RESEARCH ASSISTANT
PROFESSOR,
Department of Immunology,
University of Pittsburgh
scascio@fondazionerimed.com



Marco Fazzari, PhD
RESEARCH ASSISTANT
PROFESSOR,
Department of Pharmacology and
Chemical Biology
University of Pittsburgh
mfazzari@fondazionerimed.com



Antonio D'Amore, PhD
RESEARCH ASSISTANT
PROFESSOR,
Department of Surgery
and Bioengineering
University of Pittsburgh
adamore@fondazionerimed.com



Maria Giovanna Francipane, PhD
RESEARCH ASSISTANT PROFESSOR,
Department of Pathology
University of Pittsburgh
mgfrancipane@fondazionerimed.com



SVILUPPO DI NUOVI FARMACI

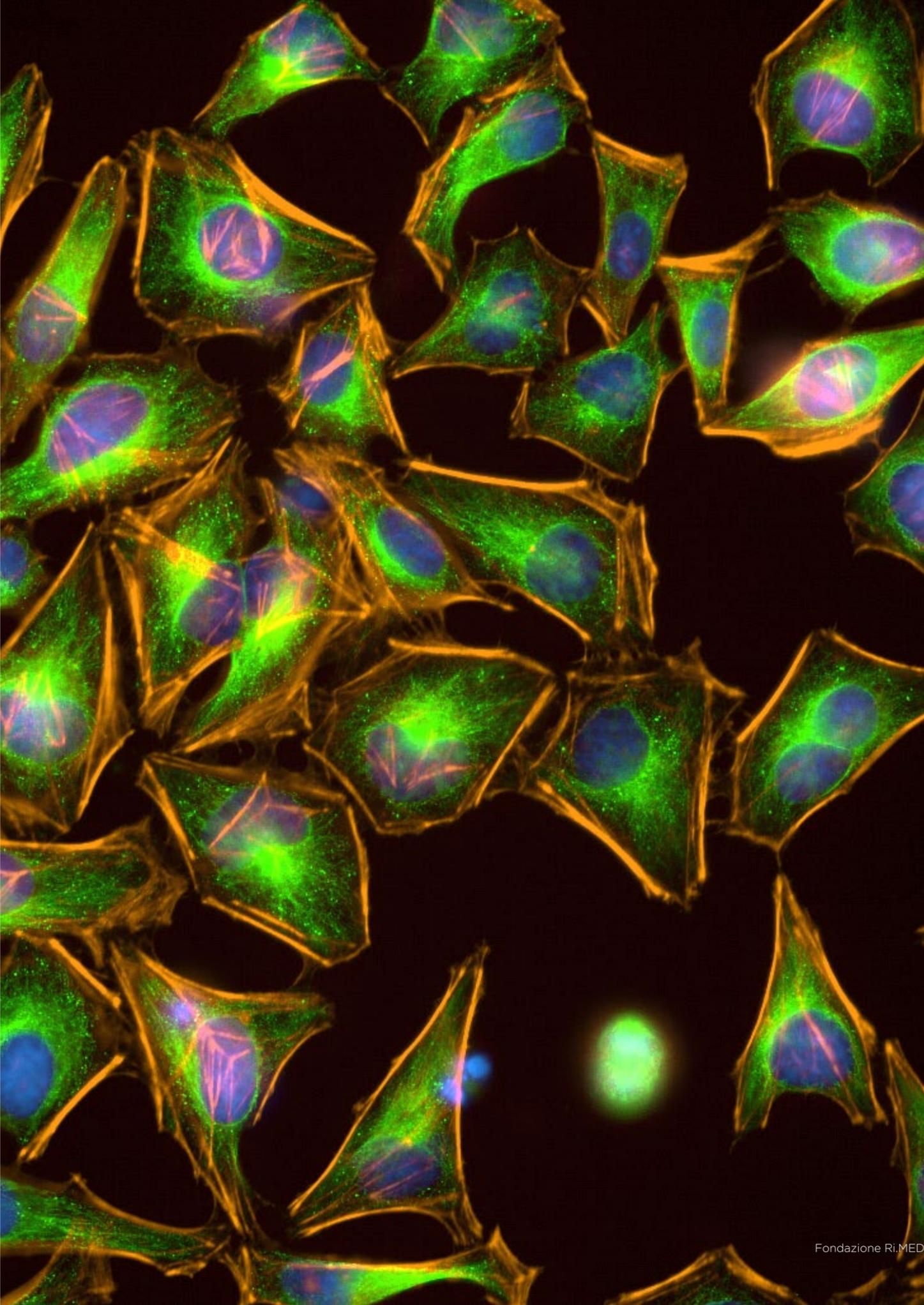
I ricercatori della Fondazione Ri.MED sono impegnati in progetti di drug discovery che mirano all'identificazione di nuove molecole biologicamente attive.

Attraverso lo studio dei *pathway* biomolecolari integrati con dati di genomica, proteomica, metabolica e secretomica, si è arrivati alla validazione funzionale di nuovi target terapeutici per patologie nelle aree terapeutiche di interesse, come per esempio l'oncologia e le malattie dell'invecchiamento.

Alcuni di questi progetti sono oggi nella fase di *screening* per la scoperta di nuovi *hit compound*. Il processo parte dallo studio delle proteine bersaglio tramite approcci di biofisica e chimica computazionale e dalla messa a punto di saggi di *screening* biofisico, biochimico o cellulare.

Grazie alla piattaforma integrata di *virtual screening* sono state selezionate, tramite tecniche *structure-based (docking)* e *ligandbased (pharmacophore)*, centinaia di molecole di origine sintetica e naturale. Durante il 2019, è stata avviata la creazione di una chemoteca che oggi consta di circa 2000 molecole. Alcune di queste sono state testate biologicamente. Le molecole attive, dette *singletons*, verranno validate attraverso studi di QSAR (relazione quantitativa struttura-attività).

Nella fase successiva, verrà selezionata la serie *hit* più promettente da un punto di vista di *druggability* e si entrerà nella fase di ottimizzazione *hit to lead*. L'obiettivo a medio termine è la selezione della molecola *lead* da sottoporre alla sperimentazione preclinica, quindi la valutazione dell'efficacia tramite studi *in vivo* integrati con *imaging* molecolare e la caratterizzazione del profilo farmacocinetico e tossicologico adatto per la sperimentazione clinica su pazienti.



Meccanismi molecolari delle malattie da *misfolding* proteico

Caterina Alfano, PhD

Modalità di legame di molecole in grado di interferire con il processo di oligomerizzazione di NPM1

Caterina Alfano, PhD

Nuovo cross-talk fra le cellule epiteliali ed i macrofagi nella colite ulcerosa e cancro al colon

Sandra Cascio, PhD

Ruolo dell'infiammasoma NLRP3 e alterazioni immuno-metaboliche nella broncopneumopatia cronica ostruttiva (BPCO)

Chiara Cipollina, PhD

Sviluppo di algoritmi per modellizzare il network di interazione di microRNA e relativi target

Claudia Coronello, PhD

Farmacocinetica degli elettrofili acidi grassi nitrati (NO₂-FA)

Marco Fazzari, PhD

Progettazione di modulatori di CD14 nella degenerazione della macula correlata a invecchiamento

Ugo Perricone, PhD

Progettazione di inibitori non covalenti di NLRP3, come potenziali nuovi farmaci antiinfiammatori

Ugo Perricone, PhD

Progettazione di modulatori della Istone lisina demetilasi 4 (KDM4) come agenti antitumorali

Ugo Perricone, PhD

Meccanismi molecolari delle malattie da misfolding proteico

Caterina Alfano, PhD
calfano@fondazionerimed.com

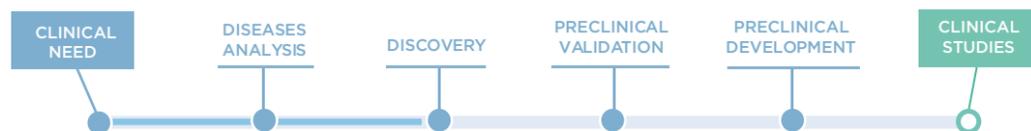
COLLABORAZIONI

- UK Dementia Research Institute (UK DRI) - King's College London, Londra, Regno Unito
- Dipartimento di Fisica e Chimica (DiFC) - Università degli Studi di Palermo, Palermo, Italia

AREA TERAPEUTICA

Patologie dell'invecchiamento

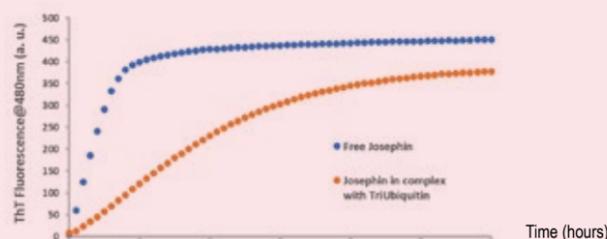
PIPELINE



BREVE DESCRIZIONE

Le malattie neurodegenerative sono una minaccia crescente della nostra società moderna sempre più invecchiata. I trattamenti attuali sono nel migliore dei casi palliativi e non specifici, riflettendo il fatto che manca ancora una comprensione dettagliata delle basi molecolari di tali patologie. La nostra ricerca mira a comprendere i meccanismi molecolari delle malattie da *misfolding* proteico e si basa sul concetto che la conoscenza della funzione fisiologica e della rete di interazione delle proteine aggregogene è uno strumento chiave per progettare molecole che possono competere in modo specifico con l'aggregazione. Le interazioni native proteina-proteina potrebbero infatti fornire importanti mezzi per alterare e controllare la funzione e l'assemblaggio delle proteine coinvolte nelle malattie neurodegenerative e potrebbero svolgere un ruolo protettivo contro l'aggregazione aberrante.

Come sistema modello in questo progetto, abbiamo selezionato l'atassina-3 (atx-3), la proteina responsabile della malattia ereditaria Machado-Joseph (MJD), nota anche come atassia spinocerebellare di tipo 3.



Time evolution of ThT fluorescence emission @480nm of both free Josephin and Josephin in complex with tri-Ubiquitin chain.

IMPATTO

Il progetto di ricerca affronta domande cruciali sia in biologia strutturale che cellulare, le cui risposte, una volta note, sarebbero essenziali per comprendere i meccanismi delle malattie neurodegenerative.

Le conoscenze acquisite aiuteranno nella progettazione di terapie specifiche e contestualmente forniranno importanti indizi sul fondamentale fenomeno del folding e assemblaggio delle proteine. Il progetto ha diversi aspetti di interesse e originalità. L'importanza cellulare della proteina scelta come sistema modello, l'atassina-3, è testimoniata dal suo coinvolgimento in malattie che fanno parte della famiglia, in costante aumento, di malattie incurabili causate da *misfolding* e aggregazione proteica, tra cui Alzheimer e Parkinson.

In caso di successo, le conoscenze acquisite nel progetto saranno utili molto più in generale per comprendere gli eventi che portano a patologie da *misfolding* proteico e forniranno nuovi strumenti per prevenirle.

RISULTATI RAGGIUNTI NEL 2019

Nell'ultimo anno ci siamo concentrati sull'effetto delle catene di poliubiquitina nella crescita di fibrille del dominio catalitico N-terminale dell'atassina-3, chiamato *Josephin*.

Quest'ultimo, sebbene non contenga il tratto di poliglutamina ed è spazialmente distante da esso, è coinvolto nel *misfolding* ed è l'elemento che determina le proprietà e la morfologia di aggregati di atassina-3.

I nostri risultati hanno confermato la nostra ipotesi che la formazione di aggregati positivi alla tioflavina sia fortemente inibita dalla presenza di catene di poliubiquitine, partner naturali dell'atassina-3. Ciò è in accordo con il ruolo aggregogenico noto di

Josephin e con l'ipotesi che quando l'atassina-3 è nello stato libero espone superfici situate sul dominio *Josephin* responsabili del legame con l'ubiquitina. La natura idrofobica di queste superfici innesca l'aggregazione e spiega il ruolo di *Josephin* quale centro di nucleazione nel processo di aggregazione anche di atassina-3 intera.

I nostri risultati con catene di poliubiquitina dimostrano che l'oscuramento delle suddette superfici idrofobiche su *Josephin*, mediante l'interazione con il suo legante naturale, impedisce l'aggregazione aberrante.

OBIETTIVI PER IL 2020

Il nostro obiettivo è una migliore comprensione del ruolo delle interazioni proteina-proteina nell'aggregazione di atassina-3 al fine di utilizzare queste informazioni per progettare farmaci specifici contro l'aggregazione.

A tal scopo, utilizzeremo un approccio interdisciplinare che combina approcci di virtual screening a tecniche biofisiche all'avanguardia come la risonanza magnetica nucleare, la calorimetria e l'interferometria al fine di sviluppare molecole in grado di modulare specifiche interazioni e stati conformazionali di atassina-3.

Per avere maggiori possibilità di successo, le molecole progettate dovranno imitare le interazioni non patologiche in cui è coinvolta l'atassina-3. Ciò sarà ottenuto utilizzando librerie di molecole peptidomimetiche negli approcci di virtual screening. I possibili heats saranno quindi confermati con esperimenti biofisici.

CONFERENZE

XLVIII National Congress on Magnetic Resonance, settembre, 2019, L'Aquila (Italia)

Resonance in Biology, settembre, 2019, Pavia (Italia)

PUBBLICAZIONI

- Santonocito R., Venturella F., Dal Pia F., Morando M.A., Provenzano A., Rao E., Costa M., Bulone D., San Biagio P.L., Giacomazza D., Sicorello A., **Alfano C.***, Passantino R.*, Pastore A. (2019) Recombinant mussel protein Pvfp-5β: a potential tissue bioadhesive. *J Biol Chem.* 294(34):12826-12835. *Co-corresponding authors.

- Fricano A., Librizzi F., Rao E., **Alfano C.**, Vetri V. (2019) Blue autofluorescence in protein aggregates "lighted on" by UV induced oxidation. *BBA - Proteins and Proteomics* 1867(11):140258.

- Zacco E., Graña-Montes R., Martin S.R., de Groot N.S., **Alfano C.**, Tartaglia G.G., Pastore A. (2019) RNA as a key factor in driving or preventing self-assembly of the TAR DNA-binding protein 43. *J Mol Biol.* 431(8):1671-1688.

Modalità di legame di molecole in grado di interferire con il processo di oligomerizzazione di NPM1

Caterina Alfano, PhD
calfano@fondazionerimed.com



COLLABORAZIONI

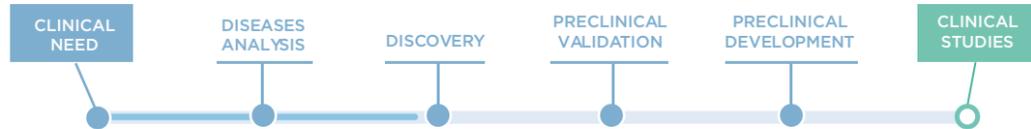
- TES Pharma - Perugia, Italia
- Dipartimento di Medicina, Sezione di Ematologia e Immunologia Clinica - Università degli Studi di Perugia, Perugia, Italia



AREA TERAPEUTICA

Cancro

PIPELINE



BREVE DESCRIZIONE

Circa un terzo dei pazienti affetti da leucemia mieloide acuta (AML), un tumore aggressivo delle cellule mieloidi, ha un'aberrante espressione citoplasmatica della proteina nucleofosmina (NPM1). Questa è una fosfoproteina nucleolare altamente abbondante con funzioni associate alla biogenesi ribosomiale, al mantenimento della stabilità del genoma, alla risposta allo stress nucleolare, alla modulazione del *pathway* del soppressore tumorale p53 e alla regolazione dell'apoptosi. È stato scoperto che circa il 35% dei pazienti adulti con AML pre-

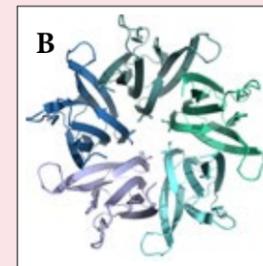
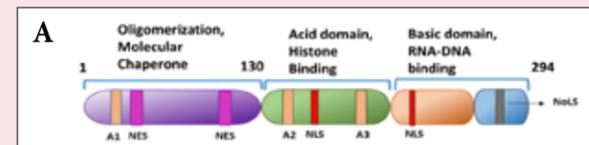
senta mutazioni eterozigoti nel dominio C-terminale di NPM1 che porta a un'espressione aberrante della proteina nel citoplasma. La natura eterozigote delle mutazioni consente che una certa quantità della proteina *wild-type* venga trattenuta dal nucleolo ed è in grado di adempiere alla sua funzione fisiologica e mantenere in vita le cellule AML. Noi miriamo a caratterizzare strutturalmente NPM1 ed eseguire uno screening biofisico per identificare molecole in grado di bloccare il ruolo fisiologico di NPM1 nelle cellule AML e interferire con il percorso vitale delle sole cellule maligne.



IMPATTO

La leucemia mieloide acuta è la leucemia acuta più comune negli adulti. I pazienti di età compresa tra 18 e 60 anni affetti da AML possono essere curati usando la chemioterapia convenzionale solo nel 50% dei casi, mentre i pazienti più anziani (> 60 anni) possono essere curati solo in una piccola percentuale (5-10%). La terapia di questa malattia rimane quindi un bisogno medico urgente, in particolare considerando la nostra società moderna sempre più invecchiata.

Si prevede che i risultati di progetto ottenuti daranno un contributo cruciale nello sviluppo di nuove strategie terapeutiche mirate alla cura di AML associate a mutazioni di NPM1, risultando in un forte impatto sull'assistenza sanitaria sia perché la AML è la leucemia acuta più comune negli adulti che perché in circa un terzo dei casi la malattia è associata a mutazioni di NPM1.



A) Domain organization of Nucleophosmin NPM1. A1-A3: acidic regions; NES: nuclear export signal; NLS: nuclear localization signal; NoLS: nucleolar localization signal.

B) X-Ray Structure of the N-terminal oligomerization domain of NPM1, PDB ID 4N8M.



RISULTATI RAGGIUNTI NEL 2019

Abbiamo eseguito esperimenti di risonanza magnetica nucleare (NMR), dicroismo circolare (CD) e *cross-linking* su tre diversi costrutti del dominio N-terminale di NPM1 (1-130, 1-130 S88E e 1-182) al fine di trovare una forma monomerica stabile da utilizzare nello screening di molecole in grado di interferire con lo stato di oligomerizzazione di NPM1. Attualmente, tutti i nostri risultati evidenziano in modo consistente la presenza di diverse forme oligomeriche in tutte le condizioni testate per tutti e tre i costrutti. Sebbene un'approfondita comprensione delle basi molecolari che guidano il processo di oligomerizzazione di NPM1 rimane lontana, i nostri risultati sono cruciali per comprendere che un approccio classico di *drug discovery* ha grandi probabilità di insuccesso.



OBIETTIVI PER IL 2020

L'inibizione dell'oligomerizzazione di NPM1 porta anche all'inibizione di importanti processi nelle cellule sane. Questo, unitamente alle difficoltà nell'esprimere e purificare un campione omogeneo e monomerico per un approccio classico di *drug discovery*, indirizza la nostra attenzione verso lo sviluppo di farmaci biologici (*nano-bodies*) in grado di modulare NPM1.

Il nostro obiettivo per il prossimo anno è quindi la creazione e la selezione di anticorpi sintetici in grado di riconoscere solo NPM1 mutata e caratterizzare le interazioni risultanti sia strutturalmente che biofisicamente, usando la risonanza magnetica nucleare (NMR), la calorimetria isoterma (ITC) e la tecnica di *BioLayer Interferometry* (BLI). Le informazioni ottenute verranno quindi utilizzate per generare anticorpi a dominio singolo, noti anche come *nano-bodies*.



CONFERENZE

- XLVIII National Congress on Magnetic Resonance, settembre, 2019, L'Aquila (Italia)
- Resonance in Biology, settembre, 2019, Pavia (Italia)



MANOSCRITTI

- Santonocito R., Ventura F., Dal Piaz F., Morando M.A., Provenzano A., Rao E., Costa M., Bulone D., San Biagio P.L., Giacomazza D., Sicorello A., Alfano C.*, Passantino R., Pastore A. (2019) Recombinant mussel protein Pvf-5B: a potential tissue bioadhesive. *J Biol Chem.* 294(34):12826-12835. *Co-corresponding authors.
- Fricano A., Librizzi F., Rao E., Alfano C., Vetri V. (2019) Blue autofluorescence in protein aggregates "lighted on" by UV induced oxidation. *BBA - Proteins and Proteomics* 1867(11):140258.
- Zacco E., Graña-Montes R., Martin S.R., de Groot N.S., Alfano C., Tartaglia G.G., Pastore A. (2019) RNA as a key factor in driving or preventing self-assembly of the TAR DNA-binding protein 43. *J Mol Biol.* 431(8):1671-1688.

PRODOTTI: BIOMARCATORI

Nuovo cross-talk fra le cellule epiteliali ed i macrofagi nella colite ulcerosa e cancro al colon

Sandra Cascio, PhD
scascio@fondazionerimed.com



COLLABORAZIONI

- Dipartimento di Immunologia, University of Pittsburgh, Pittsburgh, Stati Uniti
- Dipartimento di Gastroenterologia, University of Pittsburgh, Pittsburgh, Stati Uniti
- Dipartimento di Ingegneria Computazionale, University of Pittsburgh, Pittsburgh, Stati Uniti



AREA TERAPEUTICA

Cancro

PIPELINE



BREVE DESCRIZIONE

I macrofagi costituiscono una popolazione eterogenea che si differenzia in diversi sottotipi che sono schematicamente categorizzati in M1 and M2.

I macrofagi di tipo 1 (M1) producono citochine pro-infiammatorie (TNF, IL-12) ed hanno una attività tumoricida, mentre i macrofagi di tipo 2 (M2) producono citochine anti-infiammatorie (IL-10, IL-6, CCL17) ed inducono la progressione tumorale.

In questo progetto, abbiamo studiato il ruolo dei macrofagi M1 e M2 nella colite ulcerosa e cancro al colon.

In particolare, abbiamo scoperto che i macrofagi M2, attraverso la secrezione di due citochine: CCL17 ed IL-13, indu-

cono l'espressione della forma tumorale della glicoproteina MUC1. MUC1 è un'oncoproteina che attiva una cascata di segnali intracellulari infiammatori ed oncogenici promuovendo l'iniziazione e progressione tumorale.

I nostri dati suggeriscono che le citochine CCL17 ed IL-13 promuovono l'espressione genica della glicosiltransferasi ST6GALNAC1 e quindi inducono una iper-espressione della glicofoma MUC1-sTn nelle cellule di colon.

Le cellule coloniche sane esprimono bassi livelli di ST6GALNAC1 e della forma iperglicosilata MUC1-sTn mentre le cellule epiteliali del colon infiammate e tumorali ne esprimono alti livelli.

IMPATTO

Il micro-ambiente tumorale gioca un ruolo fondamentale nella progressione dei tumori. I macrofagi rappresentano la popolazione di cellule del sistema immunitario più abbondante dei tessuti infiammati e tumorali del colon. La caratteristica principale dei macrofagi è la loro plasticità ed abilità di cambiare facilmente il loro fenotipo e la loro funzione in risposta ai segnali dell'ambiente circostante. In nostro gruppo di ricerca ha studiato nuovi meccanismi con cui i macrofagi associati al tumore (TAM) influenzano lo sviluppo della patogenesi della colite ulcerosa e progressione del cancro al colon. Abbiamo scoperto che i macrofagi M2, secernendo citochine infiammatorie fra cui CCL17 ed IL-13, inducono l'espressione di ST6GALNAC1 e MUC1-sTn nelle cellule epiteliali del colon. Nell'ambiente tumorale si instaura un feedback positivo fra le forme alterate di MUC1 e le citochine infiammatorie che aggrava l'infiammazione cronica e promuove tumorigenesi. L'identificazione dei segnali di comunicazione fra i macrofagi e le cellule epiteliali del colon ci permetterà di identificare e selezionare nuovi composti molecolari che bloccando l'attività delle citochine CCL17 ed IL-13 potrebbero avere una risvolta importante nella prevenzione e trattamento del cancro al colon.



RISULTATI RAGGIUNTI NEL 2019

I meccanismi che regolano lo stato di O-glicosilazione di MUC1 durante l'infiammazione cronica intestinale e cancro al colon non sono ancora del tutto chiari. I nostri risultati ottenuti da esperimenti *in vitro* ed *in vivo* suggeriscono che i tessuti infiammati e tumorali di colon presentano un elevato numero di macrofagi, sia di tipo 1 (M1) che di tipo 2 (M2). Utilizzando modelli di colture cellula bidimensionali, abbiamo scoperto che i macrofagi M2 sono direttamente coinvolti nel controllo di forme alterate di MUC1. Brevemente, monociti isolate dal sangue periferico umano, sono stati differenziati nei sottotipi in M1 o M2 e poi messi in co-cultura con cellule epiteliali tumorali per tre giorni. I macrofagi M2 inducono espressione di



OBIETTIVI PER IL 2020

Il nostro obiettivo è determinare il network che si stabilisce fra le cellule mieloidi associate al tumore, fra cui i macrofagi, e le cellule epiteliali nei tumori solidi (cancro al colon, ovaio e mammella).

Ci proponiamo quindi di determinare un nuovo modello di comunicazione fra le cellule tumorale ed il microambiente circostante. Al tal fine, valuteremo il ruolo delle citochine prodotte dalle celle mieloidi nella trasformazione di una cellula sana ad una cellula tumorale. Valuteremo anche se bloccando l'attività di specifiche citochine, come per esempio IL-13 e CCL17, si può inibire l'attivazione di cascate di segnali oncogenici nelle cellule epiteliali e conseguentemente la loro trasformazione a cellule tumorali. Ci aspettiamo che prevenendo l'interazione intercellulare fra macrofagi e cellule epiteliali riusciremo a bloccare i segnali attivati dai macrofagi M2 e quindi inibire la progressione tumorale.



CONFERENZE

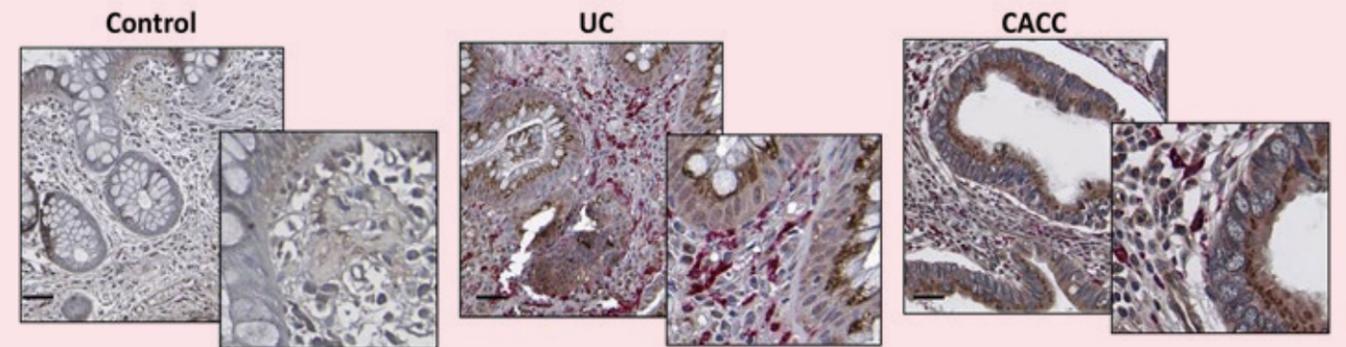
American Association of Immunologists (AAI), maggio, 2019, San Diego, USA



MANOSCRITTI

Crosstalk between colon cells and macrophages increases ST6GALNAC1 and MUC1-sTn expression in ulcerative colitis and colitis-associated colon cancer.

Kvorjak M, Ahmed Y, Miller ML, Sriram R, Coronello C, Hashash JG, Hartman DJ, Telmer CA, Miskov-Zivanov N, Finn OJ, Cascio S. Cancer Immunol Res. 2019 Dec 12. pii: canimm.0514.2019. doi: 10.1158/2326-6066.CIR-19-0514.



Representative image of ST6GALNAC1 (brown) and CD163 (magenta) double staining in paraffin-embedded human colon tissues sections from non-inflamed (Control), ulcerative colitis (UC), and colitis-associated colon cancer (CACC). Scale bars, 20 mm.

Ruolo dell'inflammasoma NLRP3 e alterazioni immuno-metaboliche nella broncopneumopatia cronica ostruttiva (BPCO)

Chiara Cipollina, PhD
ccipollina@fondazionerimed.com

COLLABORAZIONI

- Istituto per la Ricerca e l'Innovazione Biomedica (IRIB) - CNR, Palermo, Italia
- Istituto Mediterraneo per i Trapianti (ISMETT IRCCS), Palermo, Italia
- Institut de la Vision, Parigi, Francia
- Ospedale Civico Di Cristina Benfratelli, Palermo, Italia
- Dipartimento di Ingegneria - Università degli Studi di Palermo, Palermo, Italia
- Dipartimento di Biomedicina, Neuroscienze e Diagnostica avanzata, Università degli Studi di Palermo, Palermo, Italia

AREA TERAPEUTICA

Patologie dell'invecchiamento

PIPELINE



BREVE DESCRIZIONE

La broncopneumopatia cronica ostruttiva (BPCO) è una delle principali cause di morte al mondo. È una patologia associata all'invecchiamento e all'esposizione ad agenti inquinanti. È caratterizzata da una riduzione progressiva e irreversibile del flusso respiratorio. Ad oggi non esiste una terapia in grado di bloccare la progressione della BPCO, ed è quindi necessario lo sviluppo di nuovi farmaci. Rimodellamento delle vie aeree, senescenza cellulare, attivazione dell'epitelio bronchiale e disfunzione immunitaria insieme all'infiammazione cronica contribuiscono alla patogenesi della BPCO. Questi eventi coinvolgono sia le cellule strutturali (come le cellule epiteliali e i fibroblasti) sia le cellule immunitarie (come i macrofagi). Negli ultimi anni, ci siamo occupati di studiare l'immunità innata in modelli sperimentali di

BPCO, analizzando la risposta infiammatoria a carico dei macrofagi e dell'epitelio bronchiale. Il lavoro svolto nel corso dell'ultimo anno ha portato alla scoperta di un nuovo asse regolatorio responsabile dell'attivazione della caspasi-1 in maniera del tutto indipendente da NLRP3 in macrofagi esposti a fumo di sigaretta. Questo meccanismo potrebbe essere alla base delle disfunzioni immuno-metaboliche che si osservano nei pazienti fumatori e BPCO e che sono associate ad una maggiore suscettibilità alle infezioni. Lo studio di questi meccanismi molecolari è necessario al fine di individuare nuovi *target* per lo sviluppo di terapie innovative. In parallelo, poiché NLRP3 è un *target* validato per numerose patologie infiammatorie croniche, in collaborazione con il gruppo di Drug Discovery della Fondazione, stiamo lavorando allo sviluppo di nuovi inibitori selettivi di NLRP3.

IMPATTO

Il progetto contribuirà alla scoperta e alla caratterizzazione di nuovi meccanismi molecolari coinvolti nella patogenesi della BPCO. Questo, a sua volta, consentirà di individuare nuovi potenziali *target* terapeutici. Inoltre, il lavoro svolto in collaborazione con il gruppo di Drug Discovery contribuirà allo sviluppo di inibitori selettivi del recettore NLRP3 da utilizzare per lo sviluppo di nuovi farmaci. L'impatto di questo lavoro è trasversale e va oltre il contesto specifico della BPCO. Infatti, l'attivazione del recettore NLRP3 contribuisce alla patogenesi di numerose patologie croniche tra cui l'aterosclerosi, il diabete di tipo II, e le malattie neurodegenerative.

RISULTATI RAGGIUNTI NEL 2019

Il fumo di sigaretta è uno dei maggiori fattori di rischio per la BPCO. L'utilizzo di modelli sperimentali *in vitro/ex vivo* di infiammazione associata a fumo di sigaretta è in grado di mimare il contesto infiammatorio tipico delle vie aeree di un paziente BPCO. Nel 2019 il nostro lavoro si è focalizzato sullo studio degli effetti dell'esposizione a fumo di sigaretta in macrofagi derivati da monociti isolati da sangue periferico umano (hMDM). Il lavoro ha portato alla scoperta di un nuovo asse regolatorio che coinvolge TLR4, TRIF e caspasi-8 e che porta ad attivazione di caspasi-1 in modo indipendente da NLRP3. A sua volta, la caspasi-1 causa una riduzione del flusso glicolitico. Ipotizziamo che l'attivazione di questo *pathway* possa contribuire alla disfunzione immuno-metabolica osservata in soggetti fumatori e in pazienti con BPCO e possa in parte spiegare l'aumentato rischio di infezioni.

OBIETTIVI PER IL 2020

Uno dei principali obiettivi sarà la validazione e l'espansione dei dati fino ad ora ottenuti in campioni isolati da pazienti con BPCO e in gruppi controllo. Questo sarà possibile grazie alla messa a punto di avanzati modelli sperimentali basati sull'utilizzo di colture primarie e di campioni biologici derivati da pazienti. Il conseguimento di questo obiettivo sarà

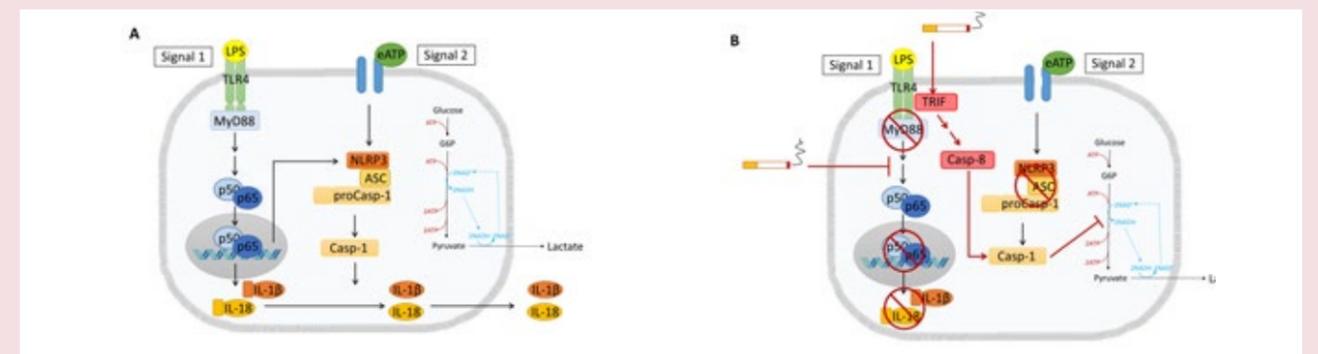
possibile grazie alla collaborazione con ISMETT IRCCS e con l'Università di Palermo - Dipartimento di Biomedicina, Neuroscienze e Diagnostica avanzata. Lavoreremo inoltre per comprendere quali siano i meccanismi molecolari che portano all'attivazione di caspasi-1 indipendente da NLRP3. Sul fronte Drug Discovery, l'obiettivo principale sarà la messa a punto e la validazione del saggio primario per lo screening di inibitori di NLRP3, a cui farà seguito lo screening vero e proprio con l'identificazione di *primary hits* e la loro validazione attraverso saggi secondari.

CONFERENZE

- Buscetta M, Di Vincenzo S, Pace E, Cipollina C "Cigarette smoke activates the TLR4/caspase-8/caspase-1 axis leading to glycolysis impairment in human macrophages". EMBO Workshop - Cell death in immunity and inflammation, 06 - 09 October 2019, Crete (Greece).
- Buscetta M, Di Vincenzo S, Pace E, Cipollina C "Cigarette smoke extract inhibits the NLRP3 inflammasome in human macrophages and impairs cell metabolism via NLRP3-independent activation of Caspase-1". European Respiratory Society 2019 International Congress, Madrid (Spagna), Set 28- Oct 02, European Respiratory Journal 54 (suppl 63) PA2409; DOI: 10.1183/13993003.congress-2019.PA2409

PUBBLICAZIONI

- Buscetta M, Di Vincenzo S, Miele M, Badami E, Pace E, Cipollina C. "Cigarette smoke inhibits the NLRP3 inflammasome and leads to caspase-1 activation via the TLR4-TRIF-caspase-8 axis in human macrophages". *Faseb J*, 2019.
- Mekni N, De Rosa M, Cipollina C, Gulotta MR, De Simone G, Lombino J, Padova A, Perricone U. "In Silico Insights towards the Identification of NLRP3 Druggable Hot Spots." *Int J Mol Sci*, 2019, 20(20). doi: 10.3390/ijms20204974.
- Ferraro M, Di Vincenzo S, Dino P, Bucchieri S, Cipollina C, Gjomarkaj M, Pace E. "Budesonide, Acridinium and Formoterol in combination limit inflammaging processes in bronchial epithelial cells exposed to cigarette smoke." *Exp Gerontol*, 2019, 118:78-87. doi: 10.1016/j.exger.2019.01.016.



Modello proposto. (A) In seguito a priming trascrizionale con LPS (Segnale 1) ed al trattamento con ATP extracellulare (Segnale 2) l'inflammasoma NLRP3 si attiva, promuovendo l'attivazione di caspasi-1 e il taglio e la secrezione di IL-1β e IL-18. (B) Quando i macrofagi sono esposti al fumo di sigaretta, la risposta viene modificata: la trascrizione di NLRP3, di pro-IL-1β e pro-IL-18 viene inibita e non è possibile la formazione del complesso dell'inflammasoma NLRP3. Inoltre, il rilascio di IL-1β e IL-18 è ridotto a causa dell'assenza dei precursori. Il fumo di sigaretta porta all'attivazione di caspasi-1 attraverso l'asse regolatorio TLR4-TRIF-caspasi-8. A sua volta, la caspasi-1 inibisce il flusso glicolitico.

Sviluppo di algoritmi per modellizzare il network di interazione di microRNA e relativi target

Claudia Coronello, PhD
ccoronello@fondazionerimed.com

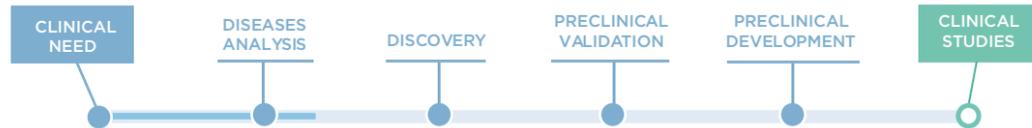
COLLABORAZIONI

- Istituto per la Ricerca e l'Innovazione Biomedica (IRIB) - CNR, Palermo, Italia
- Dipartimento di Scienze e Tecnologie Biologiche Chimiche e Farmaceutiche (STEBICEF) - UNIPA, Palermo, Italia
- Dipartimento di Scienze Economiche, Aziendali e Statistiche (SEAS) - UNIPA, Palermo, Italia
- Dipartimento di Biologia Computazionale (CSB) - University of Pittsburgh, Pittsburgh, Stati Uniti

AREA TERAPEUTICA

Cancro

PIPELINE



BREVE DESCRIZIONE

I microRNA sono piccoli filamenti di RNA con l'importante funzione di regolare l'espressione genica dei loro *target*, tra i quali compaiono gli RNA messaggeri (mRNA) codificanti per proteine. Ad oggi sono stati riconosciuti circa 2.000 microRNA e ciascuno di essi regola l'espressione di migliaia di *target*. Poiché il genoma umano comprende circa 20.000 geni codificanti per proteine, ci troviamo di fronte a una fitta e complessa rete di interazioni.

Lo scenario è in più complicato dal fatto che ciascun tessuto cellulare possiede uno specifico profilo di espressione genica, per cui la rete di interazioni che effettivamente si manifesta è diversa in ciascun tessuto. In questo progetto,

ci proponiamo di modellizzare la rete di interazione specifica di un qualsiasi tessuto cellulare, focalizzando lo studio su tessuti tumorali per individuare le anomalie sulla rete di interazioni rispetto ai rispettivi tessuti sani. I profili di espressione di microRNA e mRNA utili a modellizzare la rete di interazione specifica di un tessuto possono essere ricavati attraverso tecniche *high throughput data analysis*, come ad esempio le tecnologie basate su *microarray* o NGS. Con le suddette tecnologie è possibile misurare simultaneamente i livelli di espressione di tutti i microRNA e mRNA presenti nel tessuto in analisi. Sarà obiettivo dei nostri algoritmi sfruttare tali dati per modellizzare e confrontare le reti di interazione tra microRNA e *target* di tessuti diversi.

IMPATTO

Ricchissime sono oggi le banche dati che rendono pubblicamente accessibili *Big Data* biologici. Infatti, è apprezzata e incentivata la condivisione dei dati utilizzati per ottenere i risultati descritti nelle riviste scientifiche internazionali. Ad esempio, i profili di espressione genica, sono depositati in banche dati come *Gene Expression Omnibus* o *ArrayExpress*.

Chiunque sia interessato ad un particolare tessuto cellulare avrà già a disposizione un corredo di profili di espressione da studi già pubblicati. Tali dati offrono informazioni sull'espressione dell'intero genoma nei tessuti di interesse e vengono soprattutto utilizzati per eseguire un primo *screening* e individuare su quali marcatori focalizzare la ricerca. A fronte di una enorme mole di dati disponibili, ciò che manca sono algoritmi di analisi di dati in grado integrare più fonti di *Big Data*.

Mentre sono ormai consolidati algoritmi utili ad individuare i geni o i microRNA differenzialmente espressi tra due tipologie di tessuto cellulare, utili per individuare le anomalie nei profili di espressione di microRNA e di mRNA, non esiste ad oggi alcun metodo per individuare quali anomalie si ripercuotono sulle interazioni tra microRNA e i mRNA.

Lo sviluppo di tali metodi porterà nuovi strumenti per la comprensione delle cause di patologie come il cancro, arricchendo la ricerca di "quali sono i geni" con l'informazione su "quali sono le interazioni" coinvolte nella patologia.

RISULTATI RAGGIUNTI NEL 2019

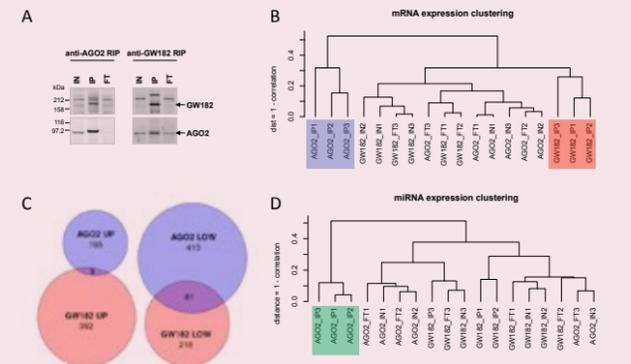
Nel 2019 ci siamo dedicati all'aggiornamento del *web-tool* ComiR, uno strumento capace di predire i *target* di un set di microRNA, corredati della loro espressione nel tessuto di interesse. Allo stato attuale, ComiR utilizza i siti di legame tra microRNA e mRNA predetti con approcci computazionali nella regione del 3'UTR. Abbiamo scoperto che, considerando anche i siti di legame predetti nella regione codificante del mRNA, i risultati prodotti da ComiR sono più attendibili e coerenti con quanto rilevato sperimentalmente. La validazione del nuovo algoritmo è stata condotta utilizzando un *dataset* di esperimenti in *D. Melanogaster* e ci stiamo occupando di realizzare un *dataset* analogo utilizzando linee cellulari umane.

OBIETTIVI PER IL 2020

Nel 2020 ci proponiamo di sviluppare un algoritmo capace di ricostruire il network di interazioni tra microRNA e mRNA. A ciascuna coppia microRNA-mRNA sarà associato un p-valore basato sull'analisi integrata dei loro profili di espressione. La principale difficoltà consiste nel fatto che non esiste una tecnica sperimentale in grado di validare tutte le interazioni tra microRNA e RNA messaggero esistenti in un tessuto, ed è pertanto impossibile fare una validazione diretta dei *network* di interazione predetti.

Per proseguire con la validazione, quindi, useremo il *network* ricavato attraverso questo algoritmo come informazione aggiuntiva per la versione aggiornata di ComiR.

Ad oggi, ComiR utilizza in input il profilo di espressione dei microRNA e ne predice i *target*. La nuova versione di ComiR sfrutterà anche il profilo di espressione di RNA messaggero, utilizzando per calcolare il *network* di interazione con il nostro algoritmo. Ci aspettiamo di migliorare le predizioni di *target* ottenute dalla versione originale di ComiR, in primo luogo perché ci limiteremo a considerare solo i geni effettivamente espressi nel tessuto in esame. In secondo luogo, anche le interazioni microRNA - RNA messaggero saranno limitate a quelle predette come funzionali dal nostro algoritmo, e confidiamo di dimostrare e validare la sua efficacia riscontrando un ulteriore aumento di performance nell'individuazione dei *target*.



Analisi di esperimenti RIP-Chip (estratto da [1]). A) Western Blot di proteine co-immunoprecipitate. B) Clustering di profili di espressione di mRNA. C) Diagramma di Venn di geni differenzialmente espressi. D) Clustering di profili di espressione di microRNA.

PRODOTTI: FARMACI

Farmacologia dei lipidi nitro-nitrati

Marco Fazzari, PhD
mfazzari@fondazionerimed.com



COLLABORAZIONI

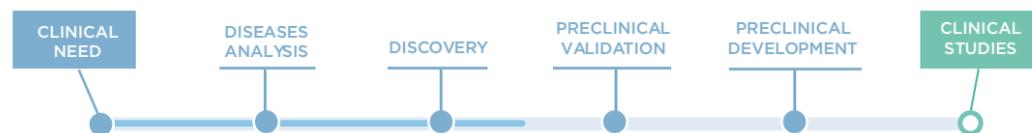
Department of Pharmacology & Chemical Biology - UPMC, Pittsburgh, Stati Uniti



AREA TERAPEUTICA

Patologie dell'invecchiamento

PIPELINE



BREVE DESCRIZIONE

Tra gli acidi grassi insaturi, l'acido linoleico coniugato (CLA) ha mostrato essere il substrato preferenziale per la generazione degli acidi grassi nitrati ($\text{NO}_2\text{-FA}$) nell'ambiente acido gastrico ed in presenza di nitrito (NO_2^-). I $\text{NO}_2\text{-FA}$ modulano la funzione enzimatica ed il segnale cellulare attraverso modificazioni proteiche post-traslazionali, mediando effetti benefici in numerose malattie infiammatorie. In questo studio, abbiamo dimostrato che la nitratura gastrica di CLA sia libero che esterificato procede attraverso la formazione di nuovi, instabili e non-elettrofili acidi grassi nitro-nitrati, i quali vengono decomposti a pH fisiologico generando acido linoleico

coniugato nitrato ($\text{NO}_2\text{-CLA}$) e rilasciando specie nitrosanti derivati dell'ossido nitrico (NO). Questi lipidi nitro-nitrati sono stati analizzati nel succo gastrico di ratti dopo somministrazione orale di livelli fisiologici di trigliceridi contenenti CLA e NO_2^- .

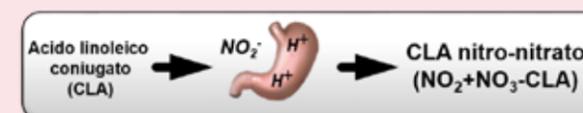
Una volta generati, i lipidi nitro-nitrati vengono assorbiti al livello intestinale portando alla formazione di $\text{NO}_2\text{-CLA}$, il quale è stato successivamente analizzato nei trigliceridi plasmatici in circolo. Quindi, la decomposizione dei lipidi nitro-nitrati potrebbe indurre non solo azioni antiossidanti e citoprotettive proprie dei $\text{NO}_2\text{-FA}$ ma anche vasodilatazione mediata dall'ossido nitrico (NO). In



IMPATTO

La ricerca proposta fornirà informazioni sulla formazione ed azioni dei prodotti appena scoperti della nitro-ossidazione degli acidi grassi, con una visione a lungo raggio nell'avanzare questa nuova classe di mediatori del segnale cellulare come potenziale strategia farmacologica per limitare il danno vascolare e cardiopolmonare derivante da stress metabolico e infiammatorio.

Da notare che i lipidi nitro-nitrati sono già coperti da una recente domanda provvisoria di brevetto internazionale (PCT) pubblicata nell'Aprile 2018 (WO2018/067709).



conclusione, la ricerca proposta identifica una nuova classe di lipidi nitro-nitrati come importanti intermedi nella formazione degli elettrofili $\text{NO}_2\text{-FA}$, e definirà i percorsi del segnale cellulare di questa classe di lipidi strutturalmente unica.



RISULTATI RAGGIUNTI NEL 2019

I nuovi lipidi nitro-nitrati sono stati caratterizzati usando diverse tecniche analitiche come la cromatografia su strato sottile (TLC), l'analisi spettrofotometrica Uv-Vis e spettrometrica di massa accoppiata alla cromatografia liquida ad alte prestazioni (HPLC-Uv-Vis, HPLC-MS/MS), e la spettroscopia all'infrarosso (IR). La formazione e la decomposizione dei lipidi nitro-nitrati sono state studiate nei ratti ed *in vitro* a differenti pH, solventi, ed in condizioni anaerobiche ed aerobiche, con l'ossigeno elemento fondamentale della loro formazione ed il pH basico della loro decomposizione. Infine, la sintesi organica di standard lipidici nitro-nitrati ha ulteriormente confermato le strutture proposte per queste specie endogene.



OBIETTIVI PER IL 2020

Gli standard lipidici nitro-nitrati saranno sintetizzati in abbondanti quantità per studiare l'assorbimento, distribuzione, metabolismo ed escrezione in roditori di questa nuova classe di lipidi recentemente scoperti. Inoltre, studieremo le risposte *in vitro* e *in vivo* ai lipidi nitro-nitrati, con particolare attenzione al potenziale per questa classe di mediatori del segnale cellulare di agire tramite meccanismi cGMP-dipendente e cGMP-indipendente.



CONFERENZE

(Presentazione orale) Society for Redox Biology and Medicine's (SfRBM) 26th Annual Conference, November 20-23, Las Vegas.



PROPRIETÀ INTELLETTUALE

Domanda provvisoria di brevetto internazionale (PCT) No. PCT/US2017/055154. Titolo: Novel reversible nitroxide derivatives of nitroalkenes that mediate nitrosating and alkylating reactions. Registrata: Oct-04, 2017. Inventori: Fazzari M., Schopfer F. and Freeman B.

Progettazione di modulatori di CD14 nella degenerazione della macula correlata a invecchiamento

Ugo Perricone, PhD
uperricone@fondazionerimed.com

 **COLLABORAZIONI**
Institut de La Vision, Parigi, Francia

 **AREA TERAPEUTICA**
Patologie dell'invecchiamento

PIPELINE



BREVE DESCRIZIONE

La degenerazione maculare legata all'età (AMD) è un disturbo multifattoriale, eterogeneo, degenerativo dell'occhio umano che colpisce i pazienti di età superiore ai 50 anni e può portare a una grave perdita della vista.

Clinicamente, sono riconosciute due forme di AMD: la forma secca, che colpisce l'80% dei pazienti e più forma grave e umida, che colpisce il restante 20%.

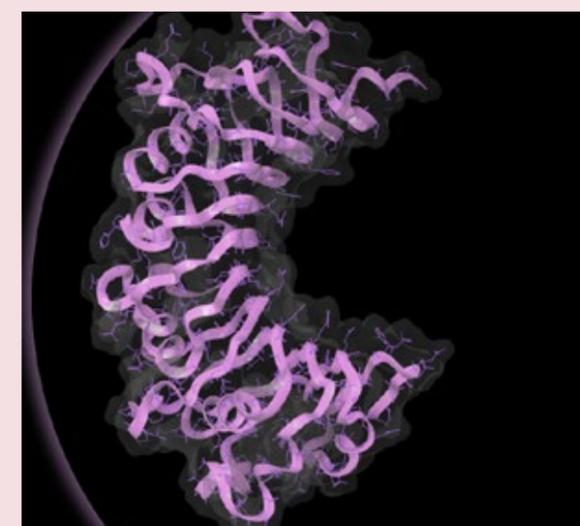
Nel quadro patologico, la proteina CD14 svolge un ruolo cruciale nel mediare il processo infiammatorio alla base della degenerazione tissutale. CD14 funge da infatti da co-recettore (insieme al recettore Toll-like TLR 4 e MD-2) per la rilevazione del lipopolisaccaride batterico (LPS). CD14 può legare l'LPS solo

in presenza di proteine leganti il lipopolisaccaride (LBP). Sebbene l'LPS sia considerato il suo ligando principale, il CD14 riconosce anche altri ligandi molecolari associati ai patogeni come l'acido lipoteicoico. Il progetto ha l'obiettivo di disegnare degli inibitori di CD14 selettivi che legandosi alla proteina possano impedire il riconoscimento dell'LPS o di altri mediatori dell'infiammazione permettendo così il ripristino della fisiologica condizione tissutale a livello della macula.

Rappresentazione di CD14, una proteina a ferro di cavallo importante per la difesa dell'organismo

IMPATTO

Attualmente la maculopatia degenerativa legata all'età è considerata la principale causa di cecità irreversibile nelle società occidentali e, dato che l'aspettativa di vita è in costante aumento, la prevalenza della malattia dovrebbe aumentare in modo significativo. Al momento però non ci sono delle vere e proprie prevenzioni per la maculopatia poiché l'eziologia è ancora oggi poco chiara: la componente genetica incide molto sulla degenerazione maculare ma il tipo e il numero dei geni coinvolti sono difficili da definire. Inoltre, ad oggi i pazienti con degenerazione maculare sono costretti a ricorrere alla pratica chirurgica. I farmaci registrati sono principalmente di natura biologica (es. anticorpi, aptameri) e non sempre risultano ef-



ficaci e sicuri nel loro impiego. Insieme ai farmaci biologici viene sempre affiancata una terapia antiossidante, perché i radicali liberi incidono molto sulla progressione della malattia. Il processo di invecchiamento va infatti ad innescare con molte probabilità reazioni ossidative che vanno successivamente a intaccare la retina e a sintetizzare i radicali liberi.

La scoperta di piccole molecole selettivamente in grado di modulare l'attività di CD14 consentirebbe dunque un efficace arresto del processo degenerativo infiammatorio e il ripristino della condizione tissutale fisiologica della macula escludendo tutti gli effetti secondari ed eventuali problemi di biodisponibilità tipici dei farmaci di natura biologica.

RISULTATI RAGGIUNTI NEL 2019

Nel 2019 il gruppo di *Computer-Aided Drug Design* ha sviluppato dei modelli computazionali principalmente basati sull'unica struttura risolta di CD14. Uno dei limiti di questo progetto è infatti l'assenza quasi totale di strutture risolte con ligandi co-cristallizzati o di molecole note e con chemotipi significativi che consentano la creazione di un modello robusto e affidabile. Tuttavia, grazie ai modelli creati dal nostro laboratorio di chimica computazionale, sono state identificate tre molecole attive che sono state confermate sia sul saggio primario che sui saggi ortogonali. Tali molecole appartengono ad un set di 65 molecole inizialmente selezionate da librerie di tipo diverse e sottoposte a *virtual screening* attraverso *docking* molecolare e farmacoforo *ligand based* creato sullo stampo di tre sole molecole LPS-like note in letteratura come modulatori di CD14.

Le nuove molecole scoperte hanno mostrato dati di attività (IC_{50}) intorno a $20\mu M$ rispondendo positivamente a tutti i saggi ortogonali effettuati. Una di queste è inoltre assimilabile ad un frammento, pertanto presenta una buona *ligand efficiency* e si presta ad ulteriori ottimizzazioni strutturali che migliorino il profilo di attività.

OBIETTIVI PER IL 2020

Il 2020 comincerà con la ricerca e la selezione di analoghi strutturali degli attivi trovati in precedenza così da poter confermare la loro attività come serie. Inoltre lo studio computazionale verrà ulteriormente approfondito al fine di irrobustire la capacità predittiva dei modelli in uso grazie ai dati ottenuti nel 2019. L'obiettivo per il 2020 sarà dunque l'ottimizzazione delle strutture chimiche, grazie alla collaborazione col gruppo di chimica medicinale della Fondazione, al fine di ottenere almeno una famiglia di hit confermata con attività al di sotto del $10\mu M$ e che mantenga una selettività per CD14. Partendo infatti dagli *scaffold* molecolari più promettenti e avendo validato il modello computazionale in uso, si procederà con il design e la sintesi di nuovi composti proprietari con buon profilo di attività e bassa tossicità.

Progettazione di inibitori non covalenti di NLRP3, come potenziali nuovi farmaci antinfiammatori

Ugo Perricone, PhD
uperricone@fondazionerimed.com



COLLABORAZIONI

Istituto per la Ricerca e l'Innovazione Biomedica (IRIB) - CNR, Palermo, Italia



AREA TERAPEUTICA

Patologie dell'invecchiamento

PIPELINE



BREVE DESCRIZIONE

L'infiammasoma NLRP3 (*NOD-like receptor family, pyrin domain-containing protein 3*) è un complesso citosolico che coordina le risposte immunitarie innate rilevando una vasta gamma di modelli molecolari associati a danni e agenti patogeni (DAMP e PAMP). In seguito ad attivazione, NLRP3 oligomerizza e si assembla con l'adattatore ASC e la pro-caspasi-1 promuovendo la scissione dipendente da caspasi-1 di pro-IL-1, pro-IL-18 e gasdermina D, con conseguente rilascio di citochine, formazione di pori e infine piroptosi. Una maggiore attivazione di NLRP3 è stata correlata a diverse patologie croniche, tra cui malattie neurodegenerative, aterosclerosi, diabete di tipo II, fibrosi e artrite reumatoide. Evidenze precliniche supportano il fatto che l'inibizione di

NLRP3 può ripristinare il fenotipo fisiologico in diversi modelli patologici, con una ridotta compromissione delle difese immunitarie dell'ospite. Pertanto, NLRP3 rappresenta un *target* farmacologico attraente. Di recente, molti gruppi di ricerca si sono concentrati sullo sviluppo di modulatori selettivi dell'infiammasoma NLRP3, molecole cioè che non interferiscano con l'attività protettiva di altri tipi di infiammasoma (NLRP4, AIM2). Tuttavia, la mancanza di informazioni strutturali sulla proteina e del suo meccanismo d'azione, nonché un meccanismo molecolare poco chiaro dei pochi inibitori noti in letteratura, rendono arduo ed estremamente complesso il compito di progettare nuovi modulatori selettivi e preferibilmente di tipo non competitivo.



IMPATTO

Le patologie legate ad infiammazione cronica sono in grande aumento nel mondo occidentale nell'ultimo decennio e ad oggi non tutti i meccanismi molecolari alla base di tali patologie sono stati chiariti dalla comunità scientifica. I farmaci attualmente utilizzati come antinfiammatori possono essere utilizzati per placare la risposta immunitaria coinvolta nell'insorgenza dell'infiammazione cronica, sopprimendo i sintomi dell'infiammazione, ma con una rara remissione completa della malattia. La farmacologia dell'infiammazione cronica si concentra principalmente su quattro gruppi di farmaci antinfiammatori: gli inibitori delle prostaglandine (FANS), i glucocorticoidi (GC), i farmaci che modificano la malattia (ad. es. Metotrexato e Sulfasalazina) e agenti bloccanti le citochine infiammatorie. La maggior parte delle terapie attuali agiscono sul sistema immunitario nel tentativo di inibire la produzione di mediatori chimici pro-infiammatori, senza però risolvere le cause della patologia. Questo progetto si pone l'obiettivo di elucidare i meccanismi molecolari alla base dell'attivazione del complesso NLRP3 e di progettare degli inibitori selettivi non covalenti e non competitivi per il sito ATPasico, così da agire sul processo che sta alla base della patologia infiammatoria mediata da NLRP3.



RISULTATI RAGGIUNTI NEL 2019

Durante l'anno 2019, il gruppo di *Computer-Aided Drug Design* ha sviluppato due approcci computazionali finalizzati al disegno razionale di modulatori dell'infiammasoma NLRP3. In particolare, il primo approccio riguarda l'inibizione del dominio NACHT della proteina NLRP3 attraverso un meccanismo non competitivo con ATP e con *binding* non covalente. Il secondo approccio invece riguarda la progettazione di inibitori proteina-proteina (PPI) che agiscono a livello del dominio PYD di NLRP3, impedendone il legame con il partner proteico PYD della proteina ASC, e quindi bloccando il reclutamento di pro-caspasi 1 la

conseguente attivazione dell'infiammasoma responsabile della risposta infiammatoria. La principale difficoltà legata alla progettazione di molecole attive su questa proteina è legata alla assenza o alla limitata disponibilità di dati strutturali, motivo per cui è stato necessario creare un modello di omologia della proteina e contribuire a elucidare le informazioni relative alla sua struttura e ad oggi fornite soltanto da uno studio cryo-EM disponibile. Grazie allo studio strutturale preliminare e all'impiego di modelli computazionali, è stato possibile selezionare 1000 composti (500 per ciascuno dei due approcci considerati) da screening *in silico* che verranno testati attraverso saggi primari e ortogonali durante l'anno 2020 dal gruppo di biologia cellulare e *High Throughput Screening* (HTS)



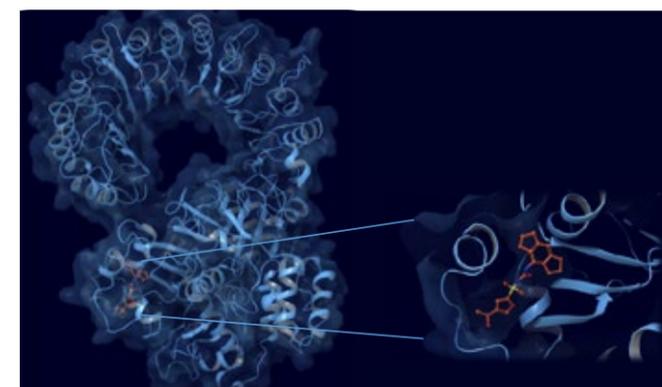
OBIETTIVI PER IL 2020

L'obiettivo dell'anno 2020 sarà quello di trovare almeno due *hit families* (una per ogni approccio considerato) che abbiano attività biologica inferiore a 10 μ M, confermata non soltanto nel saggio cellulare primario ma anche in saggi ortogonali. Al fine di ottenere delle famiglie di *hit compounds*, si partirà dai *singleton* ritrovati nello screening e che presentino un intorno chimico adeguato per modifiche strutturali, al fine di confermare e potenziare le attività riscontrate. Il gruppo di chimica medicinale si concentrerà sulla sintesi di nuove molecole nelle fasi di espansione della famiglia degli *hits* e ottimizzazione strutturale. Uno studio estensivo delle relazioni struttura-attività (SAR) fornirà gli elementi necessari per individuare potenziali *lead compound(s)* con il miglior profilo di attività biologica e proprietà farmacocinetiche (assorbimento, distribuzione, metabolismo, eliminazione, tossicità - AD-MET) delle molecole progettate. Oltre allo screening virtuale di *small molecules* e di composti di natura peptidomimetica (nel caso degli inibitori dell'interazione proteina-proteina), si procederà anche con l'analisi di librerie di frammenti al fine di esplorare al meglio gli *hot spot* presenti sulla superficie della proteina.



PUBBLICAZIONI

Mekni N., De Rosa M., Cipollina C., Gulotta M.R., De Simone G., Lombino J., Padova A., Perricone U., *In silico* insights towards the identification of NLRP3 druggable hot spots, *Int. J. Mol. Sci.* 2019, 20, 4974



Sguardo all'interno del sito attivo ipotizzato per la proteina NLRP3.

Progettazione di modulatori della Istone lisina demetilasi 4 (KDM4) come agenti antitumorali

Ugo Perricone, PhD
uperricone@fondazionerimed.com

COLLABORAZIONI

Dipartimento di medicina di Precisione, Università della Campania Luigi Vanvitelli, Napoli Italia.

AREA TERAPEUTICA

Cancro

PIPELINE



BREVE DESCRIZIONE

I processi epigenetici sono meccanismi essenziali nel funzionamento fisiologico dei modelli di espressione genica cellulari. I cambiamenti globali nello scenario epigenetico sono infatti segnali distintivi dell'iniziazione e progressione del cancro. L'N-Metilazione dei residui lisina e arginina è uno dei più frequenti meccanismi di regolazione epigenetica trascrizionale negli eucarioti.

Nell'uomo sono due le famiglie di enzimi che catalizzano la demetilazione dei residui lisinici (KDMs). La famiglia delle KDM2-7 è la più grande classe di demetilasi ed è costituita da 20 enzimi. In particolar modo, KDM4A è frequentemente amplificato e over espresso in diversi tipi di tumori umani, ad esempio nel

cancro alle ovaie, al colon o nel carcinoma a cellule squamose. L'obiettivo principale del progetto di ricerca è la progettazione razionale e la sintesi di *small molecules* in grado di modulare i meccanismi epigenetici regolati dalla Istone lisina demetilasi 4 (KDM4), e quindi potenziali farmaci per curare patologie tumorali. Il disegno razionale delle molecole prevede l'utilizzo di modelli creati *in silico* sulle proteine *target* di interesse.

Studi di *virtual screening* e di *molecular modeling* sui suddetti modelli hanno come risultato l'identificazione di potenziali *hit compounds*, e sono inoltre necessari nelle fasi di espansione/ottimizzazione di *hits* e *hit-to lead*, per guidare la sintesi chimica e quindi l'ottimizzazione strutturale delle molecole.

IMPATTO

I recenti progressi nel campo dell'epigenetica del cancro, hanno messo in luce l'importanza dei meccanismi epigenetici nello sviluppo della patologia tumorale. Particolare importanza è stata data alla metilazione del DNA, le modificazioni degli istoni, e le modifiche di espressione dei microRNA. La natura reversibile delle aberrazioni epigenetiche nelle cellule tumorali ha fin dalle prime scoperte sottolineato l'aspetto promettente della terapia epigenetica quale valida strategia terapeutica in campo oncologico. In questo contesto, i farmaci con *target* epigenetici agiscono in duplice modo, prevenendo la formazione di cellule progenitrici del cancro, e uccidendo al tempo stesso le cellule cancerose solitamente resistenti ad altri agenti terapeutici. Sebbene negli ultimi anni diversi farmaci epigenetici siano stati approvati dalle istituzioni pubbliche competenti per l'attività regolatoria, sono ad oggi in corso numerosi studi clinici, e risultano pertanto numerose le possibilità di sviluppare nuovi farmaci che agiscono a livello dei meccanismi epigenetici. In questo scenario, KDM4 rappresenta un *target* innovativo per lo sviluppo di una nuova terapia tumorale, soprattutto considerando che ad oggi non ci sono farmaci noti per essere attivi sullo stesso.

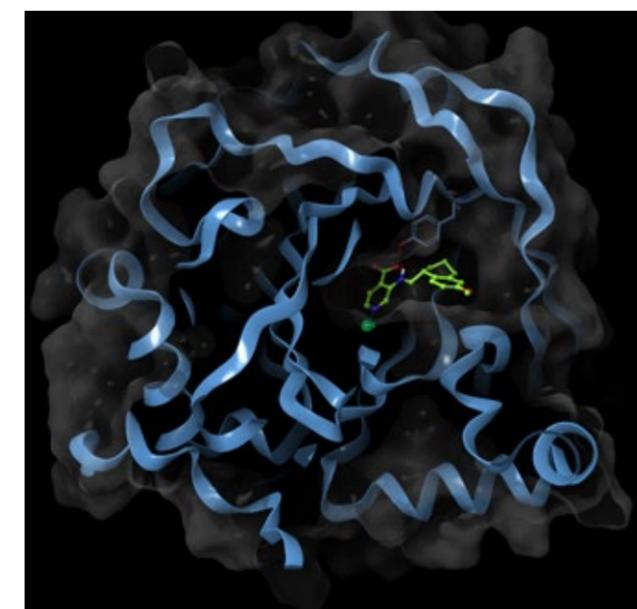
RISULTATI RAGGIUNTI NEL 2019

Durante il 2019 sono stati ottimizzati i modelli computazionali utili per la progettazione razionale di molecole ad attività inibitoria sul *target*. In particolare, il laboratorio di chimica computazionale si è focalizzato sull'utilizzo di algoritmi di *docking* molecolare, farmacofori *structure-* e *ligand-based* e approcci chemoinformatici basati sull'utilizzo di *fingerprint* molecolari. La validazione retrospettiva dei modelli computazionali e la loro applicazione nelle campagne di

virtual screening su librerie commerciali ha permesso l'identificazione di 8 molecole *hit*, che sui saggi biochimici preliminari hanno mostrato attività μM su KDM4. Le stesse molecole sono state saggiate con tecniche biofisiche (BLI) e hanno mostrato valori di costanti di dissociazione (Kd) nel range μM . Sulla base dei risultati ottenuti dagli screening, si è passati alla progettazione di analoghi strutturali delle serie di *hits* con l'obiettivo di migliorarne il profilo di attività.

OBIETTIVI PER IL 2020

Per l'anno 2020, l'obiettivo del gruppo di chimica computazionale insieme a quello di chimica medicinale è la progettazione e la sintesi di molecole strutturalmente analoghe agli *hits* preliminari trovati nel 2019, al fine di migliorarne la potenza *in vitro*, e di studiarne il profilo di tossicità e specificità verso l'isoforma KDM4A. Saggi di attività e di *binding* saranno valutati anche sulle altre isoforme di KDM, al fine di studiare la selettività dei composti. In particolare, il laboratorio di chimica medicinale si concentrerà sulla sintesi di due famiglie chimiche di *hits*. Uno studio approfondito di relazioni struttura-attività (SAR) consentirà di esplorare l'intorno chimico delle famiglie degli *hits*, con il fine ultimo di ottimizzare la struttura e potenzialmente sviluppare analoghi con il miglior profilo farmacocinetico (alta potenza ed efficacia, bassa tossicità), o più comunemente definiti *lead compound(s)*. Le molecole prodotte verranno testate *in vitro* sulle due principali forme di demetilasi coinvolte nella patologia tumorale oggetto di studio (KDM4A e KDM4C) e il profilo di attività biologica sarà valutato con saggi di tipo enzimatico, cellulari, e in studi biofisici di interazione proteina-ligando (BLI, NMR), che consentiranno di ottenere informazioni sperimentali di *binding* e razionalizzare e validare i modelli computazionali precedentemente elaborati.



All'interno del sito attivo di KDM4...un inibitore in azione



MEDICINA RIGENERATIVA E IMMUNOTERAPIA

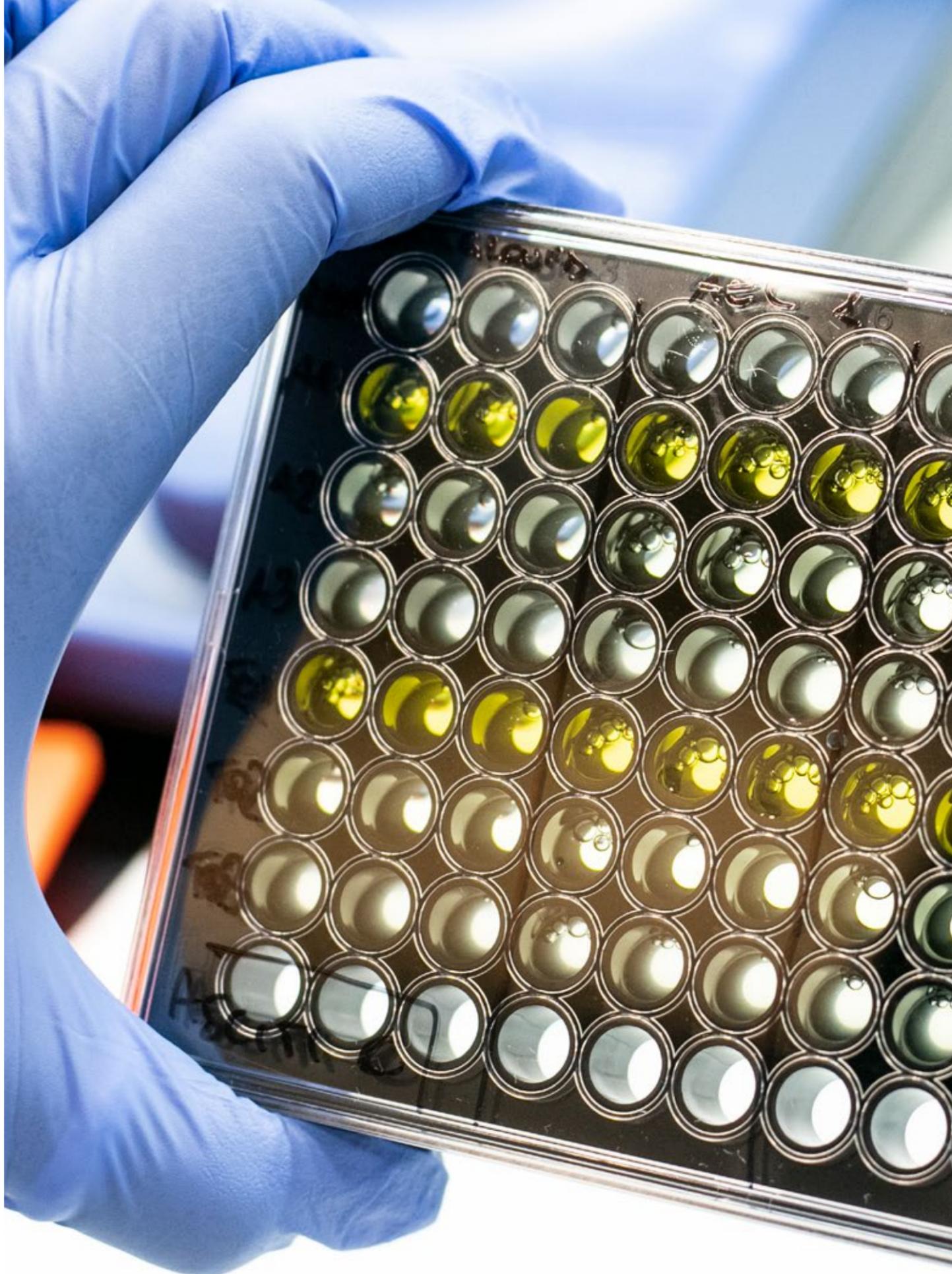
I laboratori di medicina rigenerativa e ricerca e sviluppo di terapie biologiche sono focalizzati sullo sviluppo di nuove terapie cellulari per malattie terminali d'organo e complicazioni post-trapianto, nonché sulla validazione di nuove strategie vaccinali per malattie infettive.

Le attività sono condivise con il team dell' IRCCS ISMETT. Il team è costituito da personale tecnico e ricercatori esperti in attività di ricerca e sviluppo (studi *in vitro*, *in vivo* e *first-in-man*) e in manipolazione di campioni biologici di origine umana.

Il personale è stato formato per operare secondo regole di *Good Manufacturing Practice* (GMP) e *Good Clinical Practice* (GCP) per il disegno e l'effettuazione di sperimentazioni precliniche/cliniche e la produzione di terapie avanzate.

I progetti in fase di sviluppo preclinico mirano allo sviluppo di prodotti cellulari per la riparazione e/o rigenerazione di tessuti e allo sviluppo di colture organotipiche da utilizzare sia per finalità rigenerative, sia come modelli per lo *screening* farmacologico.

Altro importante *focus* di ricerca è lo studio e lo sviluppo di terapie cellulari per la prevenzione di ricorrenze e il trattamento di infezioni post-trapianto. Alcuni progetti sono sviluppati in stretta collaborazione con i team di UP e UPMC di Pittsburgh. Questo permette di accelerare il processo di sviluppo preclinico verso il paziente grazie al trasferimento di protocolli e *know-how*. La nuova generazione di vaccini, costituita da proteine ricombinanti, è diretta alla cura delle infezioni di maggiore interesse ospedaliero di diversa eziologia.



Ingegnerizzazione di cellule CAR-NK per la cura del tumore epatico
Ester Badami, PhD

Cellule Dendritiche regolatorie nella prevenzione del rigetto di organo
Ester Badami, PhD

Ottimizzazione di approcci di tipo cell-based per il riparo di ferite cutanee croniche: soluzioni di rilascio del secretoma a base di biomateriali
Cinzia Chinnici, PhD

Immunoterapia contro *K. pneumoniae* basata su ceppi probiotici *S. cerevisiae* geneticamente modificati
Bruno Douradinho, PhD

Sorveglianza e caratterizzazione di ceppi batterici multiresistenti di rilevanza clinica
Bruno Douradinho, PhD

Rigenerare un fegato in sedi ectopiche
Maria Giovanna Francipane, PhD

Rigenerare un rene in sedi ectopiche
Maria Giovanna Francipane, PhD

OActive - Modelli computazionali avanzati, personalizzati, e multiscala per la prevenzione dell'OsteoArtrosi
Riccardo Gottardi, PhD

Linfociti T multi-virus specifici per il trattamento delle infezioni virali post trapianto
Monica Miele, PhD

Effetti della componente cellulare dell'ascite sul fenotipo delle cellule derivanti da placenta umana
Mariangela Pampalone

iRhom2: un nuovo target terapeutico in osteoartrosi?
Simone Dario Scilabra, PhD

iRhom2 regola i livelli delle molecole MHC di classe I e risposte immunitarie
Simone Dario Scilabra, PhD

PRODOTTI: **ATMP** (Advanced Therapy Medicinal Products)

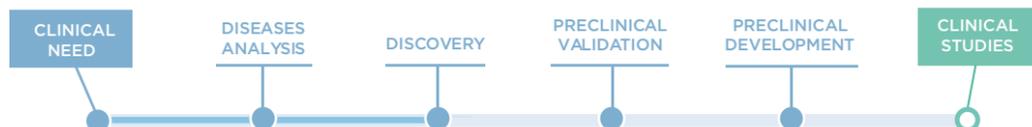
Ingegnerizzazione di cellule CAR-NK per la cura del tumore epatico

Ester Badami, PhD
ebadami@fondazionerimed.com

 **COLLABORAZIONI**
Istituto Zooprofilattico Sicilia IZS, Palermo, Italia

 **AREA TERAPEUTICA**
Cancro

PIPELINE



BREVE DESCRIZIONE

La forma più comune di cancro del fegato negli adulti è il carcinoma epatocellulare, che ha origine negli epatociti, il principale tipo di cellule di quest'organo. I pazienti con carcinoma epatico possono essere sottoposti ad asportazione chirurgica delle cellule tumorali o lobectomia parziale. Tuttavia negli stati avanzati il trapianto di fegato rimane la pratica clinica più adottata. La recidiva tumorale post-trapianto ha ancora oggi una alta incidenza, per cui servono terapie mirate più efficaci.

Le cellule Natural Killer (NK) del sistema immunitario sono in grado di distruggere qualsiasi cellula riconosciuta come tumorale (non-self). La possibilità di ingegnerizzare le cellule NK per renderle specifiche per un determinato *target* tumorale è possibile grazie alla induzione della espressione di un determinato Chimeric Antigen Receptor o CAR. Questo è

un recettore di membrana specifico per un antigene tumorale particolarmente espresso dalle cellule epatiche cancerose e non da quelle normali. Le CAR-NK così ingegnerizzate distruggono le cellule tumorali risparmiando quelle non cancerose. Inoltre, il legame del CAR al suo recettore sulla cellula tumorale attiva le cellule NK inducendo la produzione di fattori anti-tumorali.

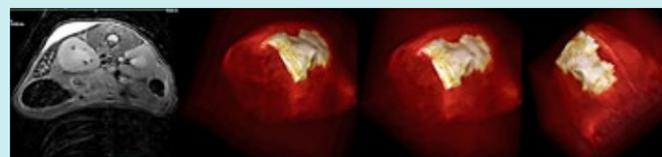


Fig. L'immagine a sinistra rappresenta un segmento trasversale dell'acquisizione tomografica al tempo 0 di un tipo inoculato sottocutaneamente sul dorso con una linea cellulare di epatocarcinoma murino. Le tre immagini a destra rappresentano la ricostruzione 3D nei tre assi dello spazio della zona inoculata. Le immagini sono state acquisite utilizzando lo strumento di Risonanza Magnetica 7Tesla Bruker in dotazione presso l'IZS. Le immagini sono state acquisite ed elaborate dal Dr Albert Comelli.

IMPATTO

Le cellule Natural Killer (NK) del sistema immunitario sono in grado di distruggere qualsiasi cellula riconosciuta come tumorale o infetta. A differenza dei linfociti T, le cellule NK non danno luogo al fenomeno della sindrome del trapianto contro l'ospite e pertanto sono quindi adatte ad una terapia "off-the-shelf", ovvero in grado di trattare un ampio numero di pazienti affetti da tumore partendo da un singolo lotto derivante da un donatore sano. In campo oncologico, le cellule CAR-NK costituiscono una delle più promettenti piattaforme per le immunoterapie cellulari, data la loro capacità di superare i limiti legati alle terapie autologhe personalizzate, con benefici significativi sia da un punto di vista tecnico sia economico.

Le cellule NK geneticamente modificate sono quindi oggi considerate uno dei settori più interessanti e innovativi della ricerca pre-clinica nell'immunoterapia cellulare.

RISULTATI RAGGIUNTI NEL 2019

La prima fase della generazione di cellule CAR-NK prevede il design del CAR stesso. Innanzitutto è stato scelto l'antigene tumorale associato all'epatocarcinoma considerandone la frequenza di espressione a livello locale (area del Mediterraneo) ma anche globale.

Dopo avere selezionato uno specifico antigene tumorale epatico, è stato sintetizzato il vettore per indurre la espressione del recettore specifico per il *target* tumorale, pensato per inoltre far esprimere alla cellula NK anche fattori anti-tumorali per aumentare la risposta immunitaria.

Il vettore così prodotto è un vettore di terza generazione perché contiene le informazioni per esprimere il recettore specifico per riconoscere il *target*, il macchinario proteico per indurre la risposta citotossica mediata dalle cellule NK una volta riconosciuto il *target* e la produzione di fattori solubili per corroborare la risposta immunitaria.

Infine, il vettore contiene anche un gene suicida, che esprime una proteina di superficie inerte e sensibile al legame dell'anticorpo Cetuximab. In caso di effetti collaterali, le cellule NK possono essere uccise fornendo al paziente il Cetuximab che legandosi alle CAR-NK ne induce la morte per opsonizzazione ed attivazione del complemento.

Il vettore così disegnato è stato introdotto in cellule NK primarie umane o nella linea cellulare NK92. Ad oggi l'efficienza di espressione del CAR è molto bassa utilizzando vettori lentivirali.

OBIETTIVI PER IL 2020

Alla luce della scarsa efficienza di trasfezione utilizzando i vettori lentivirali, si proverà ad utilizzare una metodologia alternativa quale la nucleofezione o l'elettroporazione. Abbiamo in dotazione la strumentazione necessaria per la nucleofezione che, in quanto virus-free, si presterebbe in maniera ottimale per la futura applicazione clinica. La nucleofezione funziona

inducendo dei pori sulla membrana cellulare permettendo ad eventuale materiale nucleico (DNA plasmidico/mRNA contenente il vettore) di raggiungere il nucleo della cellula. Raggiunto l'obiettivo di espressione stabile del vettore CAR sulle cellule NK, si dovrà validarne la funzione citotossica anti-tumorale e valutare se la risposta è incrementata oppure no.

La risposta immunitaria verrà valutata sia *in vitro* su linee cellulari esprimenti l'antigene tumorale. In aggiunta, valideremo la funzione anti-tumorale anche su un modello pre-clinico *in vivo* su un modello di topo immuno-compromesso (topi NGS) nei quali verrà indotto un tumore epatico umano.

I topi verranno trattati con cellule NK o CAR-NK e la crescita tumorale verrà monitorata *in vivo* tramite Risonanza Magnetica. Uno strumento di risonanza magnetica 7 Tesla è disponibile presso l'IZS.

CONFERENZE

- 5th Conference on Translational Medicine on Pathogenesis and Therapy of Immune-mediated Diseases - Maggio 2019 Milano (ITALIA)
- International Society for Cancer and Gene Therapy Annual Meeting - ISCT 2019, Maggio 2019, Melbourne (AUSTRALIA)
- Dendritic Cells Immunotherapy Days (DCID) & Next Generation Vaccines - Ottobre 2019, sede centrale Miltenyi Biotec Bergisch Gladbach (GERMANIA)

PUBBLICAZIONI

- Gallo A, Miele M, Badami E, Conaldi PG. 2019 "Molecular and cellular interplay in virus-induced tumors in solid organ recipients" Cell Immunol. Sep;343:103770. doi:10.1016/j.cellimm.2018.02.010.
- Pagano D, Badami E, Conaldi PG, Seidita A, Tuzzolino F, Barbàra M, di Francesco F, Tropea A, Liotta R, Chiarello G, Luca A, Gruttadauria S. 2019 "Liver Perfused Natural Killer Cells From Deceased Brain Donors and Association With Acute Cellular Rejection After Liver Transplantation: A Time-to-Rejection Analysis" Transplantation. 2019 Feb;103(2):371-380. doi:0.1097/TP.0000000000002322.
- Badami E, Cexus ONF, Quarantino S. "Activation-induced cell death of self-reactive regulatory T cells drives autoimmunity" 2019 Proc Natl Acad Sci U S A. Dec 9. pii: 201910281. doi:10.1073/pnas.1910281116
- Marco Buscetta, Serena Di Vincenzo, Monica Miele, Ester Badami, Elisabetta Pace, Chiara Cipollina 2019 "Cigarette smoke inhibits the NLRP3 inflammasome and leads to caspase-1 activation via the TLR4-TRIF-caspase-8 axis in human macrophages" FASEB Journal First published: 08 December 2019 <https://doi.org/10.1096/fj.201901239R>

PROPRIETÀ INTELLETTUALE

Brevetto internazionale PCT/EP2017/080848
NK-mediated immunotherapy and uses thereof

PRODOTTI: **ATMP** (Advanced Therapy Medicinal Products)

Cellule Dendritiche regolatorie nella prevenzione del rigetto di organo

Ester Badami, PhD
ebadami@fondazionerimed.com

COLLABORAZIONI

- Prof Angus W. Thomson, Starzl Institute of Transplantation, University of Pittsburgh, Pittsburgh, Stati Uniti
- Prof Fadi G. Lakkis, Starzl Institute of Transplantation, University of Pittsburgh, Pittsburgh, Stati Uniti

AREA TERAPEUTICA

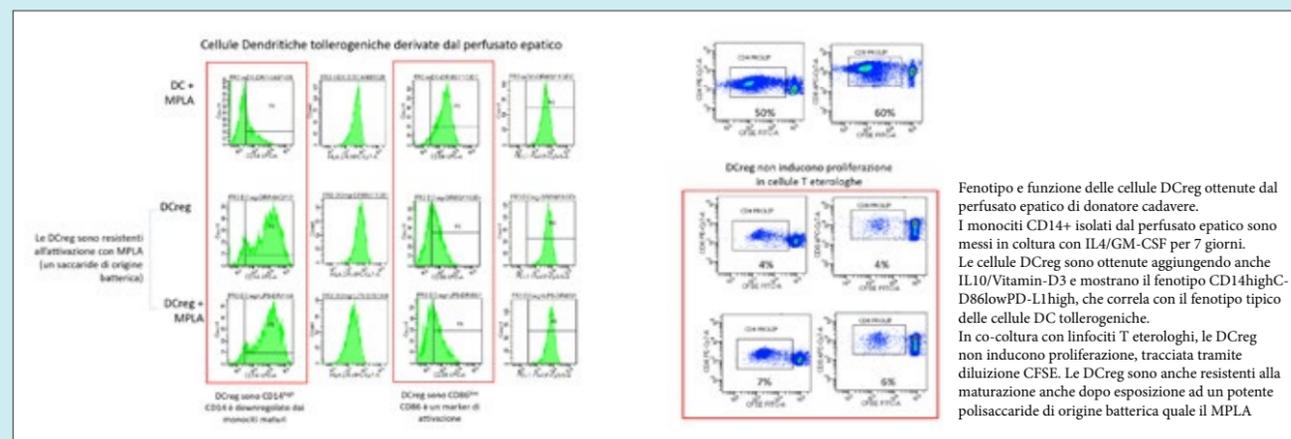
Insufficienze d'organo

PIPELINE



BREVE DESCRIZIONE

Questo studio mira alla produzione di una terapia mediata da cellule dendritiche regolatorie (DCreg) nella prevenzione del rigetto di organo solido e riduzione dei tempi di trattamento con immunosoppressori farmacologici. Il fegato è un organo tollerogenico. In questo studio, verranno considerati i pazienti trapiantati di fegato. Determineremo se è possibile isolare dal fegato cellule dendritiche regolatorie (DCreg) off-the shelf, ovvero pronte all'uso, per essere trapiantate a seguito del trapianto di fegato. Le DCreg del donatore avrebbero la funzione di indurre nel ricevente tolleranza operativa allo-specifica nei confronti delle cellule del donatore, educando così il sistema immunitario a non rigettare l'organo trapiantato. Le DCreg sono cellule dendritiche capaci di indurre ipo-responsività delle cellule T del ricevente specifiche per gli allo-antigeni del donatore e di stabilire una tolleranza immunologica a lungo termine (memoria immunitaria). La risorsa di cellule sarà il perfusato epatico, ovvero il tampone di lavaggio del fegato ottenuto prima del trapianto.



IMPATTO

I pazienti trapiantati di organo solido sono soggetti ad immunoterapia soppressiva per tutta la vita. I regimi di immunosoppressione sono associati ad effetti collaterali che a lungo termine causano malignità, problemi cardiovascolari, diabete, propensione allo sviluppo di malattie infettive ed insufficienza renale. L'ideale forma di immunosoppressione nei riceventi di organo solido è quella di indurre nel ricevente tolleranza specifica nei confronti del donatore senza però alterare le difese immunitarie generiche e quindi la propensione allo sviluppo di infezioni. Le cellule dendritiche (DCs) se opportunamente redirette, possono indurre tolleranza allo-specifica nei confronti dell'organo del donatore e mediare l'acquisizione di memoria immunitaria a lungo termine da parte delle cellule T specifiche per gli allo-antigeni del donatore. Le cellule Dendritiche regolatorie (DCreg) possono mediare l'acquisizione di tolleranza allo-specifica e la terapia mediata da DCreg permettere di sottrarre il paziente trapiantato alla terapia immunosoppressiva. Il protocollo messo a punto dai nostri collaboratori a Pittsburgh, prevede l'utilizzo di cellule DCs tollerogeniche ottenute dal sangue periferico donatore di fegato vivente. In ISMETT, la frequenza dei trapianti da donatore vivente è nettamente inferiore rispetto a quelli da donatore cadavere. L'utilizzo di una alternativa fonte di cellule dendritiche ottenibili dal donatore cadavere consentirebbe di aumentare il gruppo di pazienti trattabili con questa terapia.

RISULTATI RAGGIUNTI NEL 2019

Il risultati molto incoraggianti ottenuti nel 2019 sono innanzitutto stati possibili grazie alla forte collaborazione con il laboratorio di prof Lakkis e Prof Thomson a Pittsburgh. Il gruppo ci ha aiutato attraverso numerose conference call e fondamentale è stato il periodo di training che io ho trascorso a Pittsburgh presso i loro laboratori. Durante questo periodo ho appreso la tecnica di produzione su piccola scala delle cellule dendritiche regolatorie a partire dai monociti isolati dal sangue periferico. Oltre alla tecnica ho acquisito conoscenze scientifiche e imparato a

risolvere i problemi che erano sorti durante i primi esperimenti che davano risultati negativi. Adesso, nei laboratori di ISMETT, ho iniziato le prime colture di monociti isolati sia dal sangue periferico che dal perfusato epatico di diversi donatori ottenendo finalmente i risultati sperati. Infatti, le cellule DCreg presentano il fenotipo desiderato in quanto esprimono alte concentrazioni del marker di tollerogenicità PD-L1 e bassi livelli del marker di attivazione CD86. Funzionalmente, le cellule DCreg stimolano meno la proliferazione di cellule T allogeniche rispetto alle stesse DC coltivate in assenza dei fattori che ne inducono il differenziamento in regolatorie, Interleuchina-10 e Vitamina-D3 (Fig 1). In conclusione, siamo in grado di applicare il protocollo di produzione delle cellule DCreg già ottimizzato nei laboratori di Pittsburgh partendo dai monociti del perfusato epatico.

OBIETTIVI PER IL 2020

Per l'anno 2020 ci prefissiamo di ottimizzare la produzione su larga scala di cellule DCreg dai monociti CD14⁺ isolati dal perfusato epatico. In dotazione dei laboratori di ISMETT è lo strumento di elutriazione ELUTRA che permette di separare diverse popolazioni da prodotti derivati dal sangue quali linfociti T e monociti, ottenendo purezza elevatissima (>85%) senza dovere procedere con ulteriori dispendiosi protocolli di arricchimento cellulare come la separazione con biglie magnetiche. Le cellule DCreg così ottenute verranno testate *in vitro* per fenotipo (PD-L1^{high}/CD86^{low}) e per funzione (riduzione della proliferazione di cellule T eterologhe). Le DCreg verranno anche testate su un modello di trapianto di piccolo animale per determinare la proof-of-concept *in vivo*, indispensabile per il passaggio alla clinica, e la loro idoneità all'induzione di tolleranza operativa verso i linfociti T dell'ospite.

VISITING

Periodo di Training trascorso a Pittsburgh come *visiting scientist* presso il laboratorio di Profs F Lakkis e AW Thomson. Starzl Institute of Transplantation, Ottobre 2019

PUBBLICAZIONI

- Gallo A, Miele M, Badami E, Conaldi PG. 2019 "Molecular and cellular interplay in virus-induced tumors in solid organ recipients" Cell Immunol. Sep;343:103770. doi:10.1016/j.cellimm.2018.02.010.
- Pagano D, Badami E, Conaldi PG, Seidita A, Tuzzolino F, Barbàra M, di Francesco F, Tropea A, Liotta R, Chiarello G, Luca A, Gruttadauria S. 2019 "Liver Perfusate Natural Killer Cells From Deceased Brain Donors and Association With Acute Cellular Rejection After Liver Transplantation: A Time-to-Rejection Analysis" Transplantation. 2019 Feb;103(2):371-380. doi:0.1097/TP.0000000000002322.
- Badami E, Cexus ONF, Quarantino S. "Activation-induced cell death of self-reactive regulatory T cells drives autoimmunity" 2019 Proc Natl Acad Sci U S A. Dec 9. pii: 201910281. doi:10.1073/pnas.1910281116
- Marco Buscetta, Serena Di Vincenzo, Monica Miele, Ester Badami, Elisabetta Pace, Chiara Cipollina 2019 "Cigarette smoke inhibits the NLRP3 inflammasome and leads to caspase-1 activation via the TLR4-TRIF-caspase-8 axis in human macrophages" FASEB Journal First published: 08 December 2019 https://doi.org/10.1096/fj.201901239R

PRODOTTI: **ATMP** (Advanced Therapy Medicinal Products)

Ottimizzazione di approcci di tipo cell-based per il riparo di ferite cutanee croniche: soluzioni di rilascio del secretoma a base di biomateriali

Cinzia Chinnici, PhD
cchinnici@fondazionerimed.com

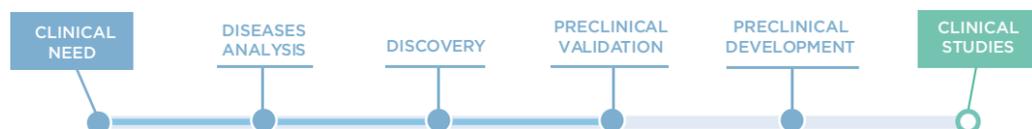
COLLABORAZIONI

- IRCCS - ISMETT, Palermo, Italia
- Laboratorio Polimeri Biocompatibili, STEBICEF - Università di Palermo, Palermo, Italia
- Dipartimento di Farmacia e Biotecnologie - Università di Bologna, Bologna, Italia

AREA TERAPEUTICA

Insufficienze d'organo

PIPELINE



BREVE DESCRIZIONE

L'efficacia terapeutica delle *mesenchymal stem cells* (MSC), quando dimostrata, è da attribuire al secretoma, definito come l'insieme dei fattori bioattivi e immunomodulatori secreti dalle cellule (fattori di crescita, citochine, chemochine, vescicole extracellulari), capaci di stimolare i processi endogeni di riparo del tessuto. Tuttavia, a differenza delle cellule, in grado di effettuare l'*homing* una volta trapiantate e di raggiungere il tessuto danneggiato, la somministrazione di secretoma necessita di biomateriali per un rilascio controllato. Il modo e la velocità con cui le cellule e i fattori solubili vengono rilasciati in corrispondenza del tessuto bersaglio ne influenza l'efficacia

terapeutica e riveste, pertanto, un'importanza fondamentale. L'obiettivo del progetto di ricerca è fornire delle soluzioni farmaceutiche che prolunghino la stabilità dei fattori solubili rilasciati dalle cellule. Al fine di soddisfare le esigenze cliniche specifiche, saranno testate diverse formulazioni di biomateriali. Il progetto è stato organizzato in tre fasi nel seguente modo:
FASE 1: caratterizzazione di fonte cellulare (ad esempio, derma fetale e cordone ombelicale) e prodotti cellulari. L'obiettivo della fase 1 è di stabilire il "miglior secretoma" per applicazioni di medicina rigenerativa quali riparo di ulcere in soggetti diabetici. I prodotti derivati dalla miglior fonte passano alla fase 2.

IMPATTO

L'uso del secretoma come terapia *cell-free* presenta molteplici vantaggi rispetto alla terapia cellulare tradizionale poiché limiterebbe i potenziali rischi legati alla somministrazione di cellule (reazioni di rigetto, tumorigenicità, trasmissione di infezioni). Inoltre, il secretoma ottenuto in forma di terreno condizionato costituirebbe un prodotto biologico pronto all'uso, più facile da gestire delle cellule e regolamentabile come farmaco per le applicazioni cliniche.

RISULTATI RAGGIUNTI NEL 2019

È stato approfondito lo studio *in vitro* dei sistemi di rilascio del secretoma, svolto in collaborazione con il laboratorio di Polimeri Biocompatibili dello STEBICEF. Sono state individuate due tipi di formulazioni, ovvero *hydrogels* di HA-EDA funzionalizzate e non con eparina, integrate col secretoma di MSC fetali dermiche. Inoltre, la collaborazione col dipartimento di Farmacia e Biotecnologie dell'Università di Bologna ci permetterà di testare le due formulazioni di *hydrogel* in un modello murino di ulcera diabetica (*preclinical proof of concept*). Due manoscritti sono pronti per la submission (Chinnici CM et al. "Exosomes of human mesenchymal stromal cells from fetal dermis and their microRNA cargo: putative target genes related to angiogenesis and wound healing"; Chinnici CM et al. "Hyaluronic acid/heparin-based hydrogels as delivery solutions for mesenchymal stromal cells and their secretome"). I risultati fin qui ottenuti, sono stati utilizzati per la stesura e la sottomissione (novembre 2019) dell'omonimo progetto su bando del Fondo integrativo speciale per la ricerca (FISR) del MIUR (si veda sezione "Finanziamenti per ricerca" presente volume).

OBIETTIVI PER IL 2020

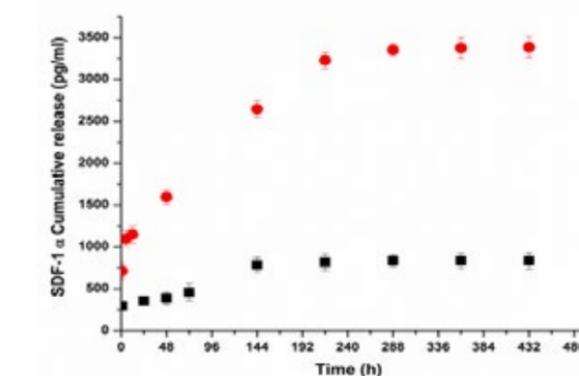
Studio preclinico in collaborazione con IRCCS-ISMETT, STEBICEF e Fondazione IRET (UNIBO) (HA-EDA hydrogels integrati con MSC secretome in un modello murino di ferita diabetica). Il titolo dello studio è ancora da definire.

CONFERENZE

7th International Stem Cell Meeting (12 e 13 novembre 2019, Tel Aviv)

PUBBLICAZIONI

- Miceli V, Chinnici CM, Bulati M, Pampalone M, Amico G, Schmelzer E, Gerlach JC, Conaldi PG Comparative study of the production of soluble factors in human placenta-derived mesenchymal stromal/stem cells grown in adherent conditions or as aggregates in a catheter-like device. *Biochem Biophys Res Commun.* 2019 Nov 19. pii: S0006-291X(19)32189-8. doi: 10.1016/j.bbrc.2019.11.06
- Mesenchymal stromal cells isolated from human fetal liver release soluble factors with a potential role in liver tissue repair. Chinnici CM, Pietrosi G, Iannolo G, Amico G, Cuscino N, Pagano V, Conaldi PG. *Differentiation.* 2019 Jan - Feb;105:14-26. doi: 10.1016/j.diff.2018.12.00



Rilascio prolungato di SDF1 -alpha dall'hydrogel di HA-EDA



Spugna di HA-EDA hydrogel

Immunoterapia contro *K. pneumoniae* basata su ceppi probiotici *S. cerevisiae* geneticamente modificati

Bruno Douradina, PhD
bdouradina@fondazionerimed.com

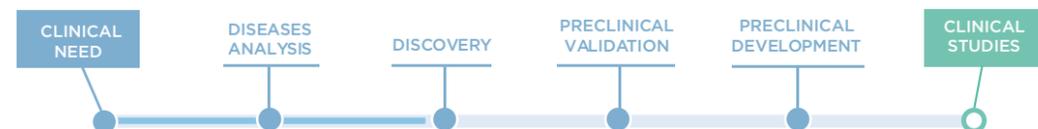
COLLABORAZIONI

- Istituto Mediterraneo per i Trapianti e Terapie ad Alta Specializzazione (IRCSS-ISMETT), Palermo, Italia
- Università degli Studi di Siena, Siena, Italia
- Azienda Ospedaliera Universitaria Careggi, Firenze, Italia
- Università degli Studi di Messina, Messina, Italia
- GSK Vaccines, Siena, Italia

AREA TERAPEUTICA

Malattie infettive

PIPELINE



BREVE DESCRIZIONE

In questo progetto, proponiamo l'uso di ceppi probiotici *Saccharomyces cerevisiae* come una nuova strategia di immunoterapia per prevenire e curare le infezioni da *Klebsiella pneumoniae*. Questi lieviti saranno geneticamente modificati per esprimere nelle loro proteine di superficie coinvolte nell'adesione di *K. pneumoniae* alle cellule umane.

Si prevede che questi lieviti ricombinanti, una volta somministrati, siano in grado di indurre una risposta immunitaria contro gli antigeni di questo batterio patogeno, agendo così come potenti vaccini mucosali.

Allo stesso tempo, questi lieviti probiotici potrebbero indurre una risposta immunitaria a livello di mucosa intestinale, prevenendo così la colonizzazione batterica e le successive infezioni sistemiche. L'immunoterapia proposta funzionerebbe anche per i ceppi di *K. pneumoniae* multiresistenti ai farmaci, poiché i meccanismi che portano alla resistenza non possono evitare una risposta immunitaria diretta contro questi batteri. Siamo convinti che questo nuovo approccio sarà efficace contro *K. pneumoniae* e aiuterà a combattere questi agenti patogeni multiresistenti.

IMPATTO

K. pneumoniae è un batterio Gram-negativo di importanza clinica, che colonizza prontamente le superfici della mucosa e, da lì, ha accesso ad altri tessuti e stabilisce infezioni gravi. È stata riportata resistenza a diversi antibiotici, riducendo il numero di trattamenti efficaci. *K. pneumoniae* sta diventando sempre più un problema di salute pubblica. In effetti, l'Organizzazione Mondiale della Sanità ha pubblicato una lista di batteri resistenti agli antibiotici in cui la necessità di nuovi interventi contro *K. pneumoniae* è considerata cruciale. Ad oggi, nessun vaccino è disponibile contro *K. pneumoniae*. Riteniamo che i ceppi probiotici di *S. cerevisiae* possano rappresentare una strategia di immunizzazione ideale contro i patogeni che richiedono una risposta immunitaria a livello della mucosa per prevenire infezioni, ad esempio, batteri gastrointestinali o HIV.

Nel caso specifico di *K. pneumoniae*, l'uso di ceppi probiotici geneticamente modificati per esprimere proteine coinvolte nei processi di adesione di questo batterio impedirebbe la sua colonizzazione

attraverso l'induzione di una risposta immunitaria a livello di mucosa e, di conseguenza, ridurrebbe la probabilità di ulteriori infezioni sistemiche. Allo stesso tempo, funzionerebbe come un approccio di vaccinazione: una volta che i lieviti geneticamente modificati sono fagocitati dalle cellule dendritiche e macrofagi, inducono una risposta immunitaria contro *K. pneumoniae*.

RISULTATI RAGGIUNTI NEL 2019

Nel corso di quest'anno, ci siamo concentrati sul clonaggio, l'espressione e la purificazione di proteine ricombinanti in *Escherichia coli*, che verrebbero utilizzate per valutare e confrontare l'efficacia del metodo dei lieviti probiotici rispetto a un vaccino contro *K. pneumoniae*. Tramite vaccinologia inversa, abbiamo analizzato genomi sequenziati di *K. pneumoniae* disponibili su database online e abbiamo trovato 528 proteine conservate. Di queste, abbiamo selezionato le proteine con una dimensione superiore a 250 kDa e localizzate nella membrana esterna o extracellulari, che erano 7. Abbiamo confermato la presenza di queste proteine nei genomi sequenziati di isolati clinici dell'Azienda Ospedaliera Universitaria Careggi e dell'IRCCS-ISMETT, in un totale di 606 isolati. Dei 7 potenziali antigeni, 4 erano presenti in più di 95% degli isolati clinici. Questi 4 antigeni sono stati clonati ed espressi e in questo momento stiamo avviando la procedura di ottimizzazione della purificazione di proteine in collaborazione con Caterina Alfano, Fondazione Ri.MED/ATeN Center, a Palermo.

In parallelo, abbiamo clonato degli antigeni di riferimento di *K. pneumoniae*, MrkA e MrkD, nella superficie del lievito probiotico *Saccharomyces boulardii* e del lievito non probiotico *Saccharomyces cerevisiae* BY4743. Il successo del clonaggio è stato confermato tramite screening PCR e RT-PCR.

OBIETTIVI PER IL 2020

I nostri obiettivi per il 2020 sono di purificare i potenziali antigeni individuati tramite vaccinologia inversa. Una volta ottenuti gli antigeni ricombinanti, faremo dei saggi ELISA usando sieri di pazienti che hanno subito un'infezione di *K. pneumoniae* e verificheremo la presenza di anticorpi sviluppati contro gli antigeni studiati. Questo ci dirà se gli antigeni scelti sono immunogenici per se, ossia, se durante il corso naturale di un'infezione con *K. pneumoniae* se si sviluppano anticorpi naturali contro questi antigeni. Stiamo avviando anche la procedura per l'autorizzazione per fare gli studi sugli animali. Questo ci permetterà di ottenere siero contenendo anticorpi contro gli antigeni scelti e studiare l'immunogenicità di questi antigeni, ad esempio, il loro potenziale di indurre una risposta immunitaria umorale. Gli anticorpi ottenuti saranno anche usati in altri saggi, ad esempio, per controllare l'espressione degli antigeni nella superficie dei lieviti trasformati o in un approccio di immunizzazione passiva.



Isolato clinico di *K. pneumoniae*

PRODOTTI: FARMACI BIOLOGICI

Sorveglianza e caratterizzazione di ceppi batterici multiresistenti di rilevanza clinica

Bruno Douradina, PhD
bdouradina@fondazionerimed.com

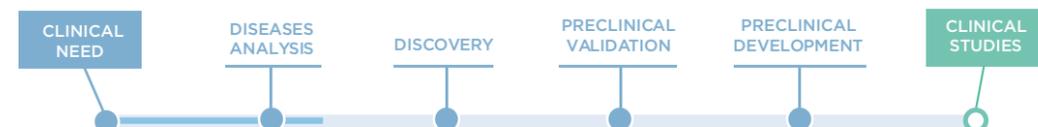
COLLABORAZIONI

- Istituto Mediterraneo per i Trapianti e Terapie ad Alta Specializzazione (IRCCS-ISMETT), Palermo, Italia
- Università degli Studi di Siena, Siena, Italia
- Azienda Ospedaliera Universitaria Careggi, Firenze, Italia

AREA TERAPEUTICA

Malattie infettive

PIPELINE



BREVE DESCRIZIONE

Con questo progetto, vogliamo caratterizzare ceppi batterici particolari e/o multiresistenti che derivano dalla continua sorveglianza microbiologica presso il nostro partner clinico IRCCS-ISMETT. Il loro potenziale patogeno sarà valutato *in vitro*, per capire se questi isolati batterici possono diventare rilevanti al livello clinico.

Gli isolati clinici batterici che dimostrano un particolare fenotipo, per esempio la resistenza a un particolare farmaco o una serie di farmaci, avranno il loro materiale genomico

sequenziato e confrontato con le informazioni attualmente disponibili nei database pubblici.

Una volta identificati i modelli di resistenza ai farmaci, questi isolati clinici saranno classificati di conseguenza e, se si riscontra un particolare sequence type (ST) o nuove specie, sarà ulteriormente caratterizzato da saggi *in vitro*, ad esempio l'abilità di formazione di biofilm abiotico e cellulare e resistenza al siero umano.

IMPATTO

Valutando sia la loro rilevanza clinica che la loro predominanza, possiamo capire se sono necessari nuovi interventi contro questi ceppi specifici, come un vaccino o un'immunoterapia.

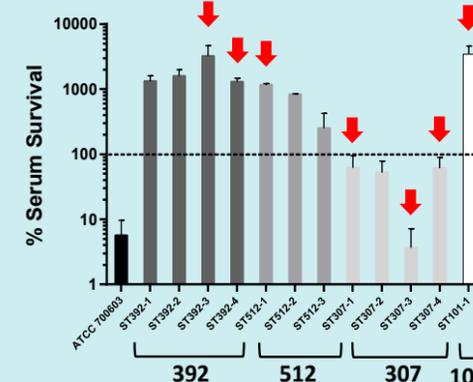
La predominanza di tali isolati clinici batterici sarà confrontata con ciò che è attualmente osservato in entrambi gli scenari nazionale e internazionale, per capire se la realtà siciliana riflette ciò che accade a livello epidemiologico in tutto il mondo o se sorgono nuovi ST nel nostro partner clinico IRCCS-ISMETT. Ciò è molto importante in quanto consentirà la definizione di profilassi e regimi di trattamento corretti e/o nuovi per i pazienti che devono sottoporsi a un trapianto e, quindi, di sopprimere il loro sistema immunitario per evitare il rigetto dell'organo.

RISULTATI RAGGIUNTI NEL 2019

Abbiamo caratterizzato il potenziale di virulenza degli isolati di *K. pneumoniae* ST392 che producono l'enzima KPC-3, responsabile per l'antibioticoresistenza. Per quanto ne sappiamo, noi abbiamo isolato il primo ceppo di *K. pneumoniae* ST392 che produce KPC in Europa. Abbiamo valutato il loro potenziale di virulenza, per capire se questo ST in particolare può diventare endemico a livello clinico.

I ceppi di ST392 e i rappresentanti di altre ST produttrici di KPC clinicamente rilevanti, aggiunti per il confronto, sono stati studiati per valutare il loro potenziale di virulenza, vale a dire resistenza ai sieri umani, formazione di biofilm abiotici e biotici e patogenesi *in vivo* per infezione delle larve del lepidottero di cera *Galleria mellonella*. I ceppi appartenenti alla ST392 erano altamente resistenti ai sieri umani.

Questi ceppi hanno un'alta capacità di formare biofilm abiotici e di adesione a una linea cellulare di adenocarcinoma epiteliale umano. È stato osservato un aumento dei livelli trascrizionali di geni coinvolti nella resistenza sierica (*aroE* e *traT*) e nell'adesione



Pneumoniae ST392 che producono KPC-3 isolati clinici sono resistenti al siero umano

(pgaA). L'infezione di larve di *G. mellonella* con isolati clinici ST392 ha dimostrato che questi ultimi non erano altamente patogeni in questo modello. Insieme, i nostri risultati indicano che gli isolati di ST392 hanno il potenziale per diventare un ceppo di rilevanza clinica, specialmente in contesti di salute in cui i pazienti sono immunodepressi, ad esempio i pazienti sottoposti a trapianto

OBIETTIVI PER IL 2020

I nostri obiettivi per il 2020 sono di finire e pubblicare i dati sopra descritti. La letteratura ha dimostrato che gli isolati clinici di *K. pneumoniae* ST392 che producono KPC-3 si stanno diffondendo rapidamente in Europa e riteniamo che i nostri dati siano importanti e confermano la tendenza endemica di questi isolati e dovrebbero essere resi disponibili. Ciò consentirà ad altri ricercatori di avere maggiori informazioni sui ceppi di *K. pneumoniae* ST392 che producono KPC-3, che fornirà loro più strumenti per sapere come trattare questi isolati batterici nosocomiali.

Continueremo anche il programma di sorveglianza per capire se si stanno diffondendo più ceppi di questo ST particolare tra i pazienti del nostro partner clinico, l'IRCCS-ISMETT.

CONFERENZE

8° Congress of European Microbiologists FEMS, Luglio, 2019, Glasgow (Regno Unito)

Ri.MED Research Retreat, October, 2019, Palermo (Italia)

PUBBLICAZIONI

- Mularoni A, Martucci G, Douradina B, Campanella O, Hazen B, Medaglia A, Arena G, Gruttadauria S, Tuzzolino F, Arcadipane A, Gioè S, Luca A, Conaldi PG, Grossi P, Gridelli B. (2019) Epidemiology and successful containment of a carbapenem-resistant Enterobacteriaceae outbreak in a Southern Italian Transplant Institute. *Transpl Infect Dis*, 21(4), e13119. doi: 10.1111/tid.13119

- Di Mento G, Carreca AP, Monaco F, Cuscino N, Cardinale F, Conaldi PG, Douradina B. (2019) Mycobacterium saskatchewanense strain associated with a chronic kidney disease patient in an Italian transplantation hospital and almost misdiagnosed as Mycobacterium tuberculosis. *Infect Control Hosp Epidemio*, 40(4), 496-497. doi: 10.1017/ice.2019.6

PRODOTTI: **ATMP** (Advanced Therapy Medicinal Products)

Rigenerare un fegato in sedi ectopiche

Maria Giovanna Francipane, PhD
mgfrancipane@fondazionerimed.com

COLLABORAZIONI

- LyGenesis, Inc, Pittsburgh, Stati Uniti
- Mayo Clinic, Rochester, Minnesota, Stati Uniti

AREA TERAPEUTICA

Insufficienze d'organo

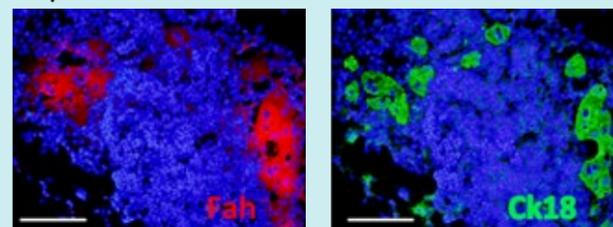
PIPELINE



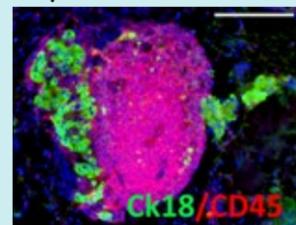
BREVE DESCRIZIONE

Ricerche innovative condotte dal Prof. Eric Lagasse e i membri del suo laboratorio hanno di recente portato all'istituzione di LyGenesis, Inc., un'azienda biotecnologica centrata sull'uso del linfonodo (LN) come bioreattore per la rigenerazione di organi funzionanti. Il programma principale di LyGenesis è focalizzato sulla rigenerazione epatica. L'iniezione di cellule epatiche nei LN di topi carenti dell'enzima FAH ha dato origine a mini-fegati funzionanti in grado di ripristinare la funzionalità epatica compromessa. Altri studi sul maiale e il cane sono stati incoraggianti, e LyGenesis inizierà presto il trial clinico su pazienti con malattia epatica allo stadio terminale.

Day 2



Day 3



Gli epatociti attecchiscono nei linfonodi velocemente dopo il trapianto.
Due e tre giorni dopo l'iniezione intraperitoneale di epatociti in topi Fah^{-/-}. Dopo due giorni, alcuni epatociti Fah+CK18+ sono localizzati nel sistema linfatico vicino ai linfociti. Dopo tre giorni, gruppi di epatociti CK18+ vengono osservati in associazione con cellule ematopoietiche CD45+.

IMPATTO

Ogni anno, circa 14.000 pazienti sono in attesa di un trapianto di fegato negli USA. Il problema è peggiore a livello globale, e rappresenta uno degli ostacoli principali in medicina. Data la carenza universale di organi da trapiantare e le risorse limitate, sono necessarie alternative al trapianto d'organo. L'efficacia delle terapie cellulari per il trattamento dell'insufficienza epatica è ostacolata dall'infiammazione e fibrosi del fegato malato. Sedi anatomiche alternative per il trapianto degli epatociti potrebbero fornire un ambiente più idoneo al loro attecchimento e proliferazione. I LN e altri aggregati linfoidi rappresentano siti alternativi promettenti grazie a numerose caratteristiche. A seconda dello stadio della malattia, la rigenerazione di un fegato all'interno di questi siti potrebbe servire come "ponte" al trapianto, o se fatto sufficientemente prima, eliminare la necessità del trapianto. Ma soprattutto, invece di trattare un paziente con un organo, LyGenesis propone il trattamento di dozzine di pazienti con un solo organo. Invece di una chirurgia invasiva, LyGenesis propone l'endoscopia ambulatoriale.

RISULTATI RAGGIUNTI NEL 2019

TOPO: Gli aFALCs sono aggregati linfoidi altamente vascolarizzati simili ai LN, localizzati nel tessuto adiposo della cavità addominale. A seguito di iniezione intraperitoneale, gli epatociti sono attecchiti e hanno proliferato negli aFALCs, formando noduli epatici funzionanti che hanno guarito topi carenti dell'enzima FAH dall'insufficienza epatica. In assenza di aFALCs, abbiamo registrato una riduzione della crescita degli epatociti iniettati. Viceversa, inducendo un aumento degli aFALCs tramite infiammazione, siamo stati in grado di generare un numero maggiore di noduli epatici e di conseguenza, abbiamo guarito un numero maggiore di topi. Gli aFALCs possono quindi essere definiti come strutture uniche nella cavità peritoneale che

possono facilitare lo sviluppo di un fegato funzionante.

MAIALE: Maiali carenti dell'enzima FAH hanno ricevuto il trapianto autologo di epatociti nei LN dopo trasduzione con vettore lentivirale esprimente il gene *fah*. Gli epatociti trapiantati hanno mostrato un attecchimento nei LN rapido (6 ore) e durevole (8 mesi). Inoltre, gli epatociti trapiantati sono migrati nel fegato nativo, ripopolandolo. Le cellule corrette hanno generato abbastanza massa epatica da ripristinare la funzionalità epatica in soli 97 giorni dal trapianto, con completa normalizzazione dei livelli di tirosina. Analisi dei siti di integrazione hanno indicato che la popolazione degli epatociti corretti nel fegato erano una sottopopolazione di cellule presenti nei LN, dimostrando che il LN può servire come fonte di epatociti sani per ripopolare un fegato malato.

CANE: Durante il 2019, il laboratorio Lagasse e LyGenesis hanno completato ulteriori esperimenti preclinici nel cane. Epatociti canini, isolati in regime GMP-like, sono stati trapiantati in LN mesenterici di cani riceventi direttamente o indirettamente (tramite via endoscopica). Prima del trapianto, i cani riceventi sono stati sottoposti ad epatotomia parziale o ad uno shunt portocavale (diversione del flusso sanguigno dal fegato) per mimare il danno epatico. Sono stati trapiantati sia epatociti autologhi che allogenei. Questi ulteriori studi hanno stabilito la sicurezza e la tollerabilità dell'approccio terapeutico basato sull'uso del LN.

OBIETTIVI PER IL 2020

Saranno studiati i meccanismi cellulari e molecolari che permettono lo sviluppo epatico negli aFALCs. Verrà iniziato un trial clinico di fase IIa su pazienti con malattia epatica allo stadio terminale, utilizzando la tecnologia linfonodale.

CONFERENZE

POSTER
C.T. Nicolas, R.D. Hickey, K.L. Allen, Z. Du, R.M. Guthman, C.J. VanLith, B. Amiot, L. Suksanpaisan, B. Han, M.G. Francipane, A. Cheikhi, H. Jiang, A. Bansal, M.K. Pandey, I. Garg, V. Lowe, A. Bhagwate, D. O'Brien, J.A. Kocher, T.R. DeGrado, S.L. Nyberg, R.A. Kaiser, E. Lagasse, J.B. Lillegard. ASGCT 22nd Annual Meeting. April 29 - May 2. Washington, DC, USA. Abstract published in Molecular Therapy. April 2019. Vol 27, No 4S1.

PUBBLICAZIONI

- Nicolas CT, Hickey RD, Allen KL, Du Z, VanLith CJ, Guthman RM, Amiot B, Suksanpaisan L, Han B, Francipane MG, Cheikhi A, Jiang H, Bansal A, Pandey MK, Garg I, Lowe V, Bhagwate A, O'Brien D, Kocher JPA, DeGrado TR, Nyberg SL, Kaiser RA, Lagasse E, Lillegard JB. Ectopic hepatocyte transplantation cures the pig model of tyrosinemia. bioRxiv 648493. 2019 May.
- Ectopic Liver Development in Abdominal Fat-associated Lymphoid Clusters (aFALCs). *In preparation.*

PRODOTTI: **ATMP** (Advanced Therapy Medicinal Products)

Rigenerare un rene in sedi ectopiche

Maria Giovanna Francipane, PhD
mgfrancipane@fondazionerimed.com

COLLABORAZIONI

- Children's Hospital of Pittsburgh of UPMC, Pittsburgh, PA, Stati Uniti
- Maine Medical Center Research Institute, Scarborough, ME, Stati Uniti
- University of Southern California, Los Angeles, CA, Stati Uniti

AREA TERAPEUTICA

Insufficienze d'organo

PIPELINE



BREVE DESCRIZIONE

850 milioni di persone nel mondo hanno una malattia renale. Le malattie renali comprendono un ampio spettro di condizioni con eziologia, decorso clinico, e severità funzionale diversi, che vanno dall'insufficienza renale acuta (AKI) ai vari stadi di insufficienza renale cronica (CKD), ed includono la malattia renale allo stadio terminale (ESRD), che richiede la dialisi e il trapianto. Con circa 2,4 milioni di vittime ogni anno, l'ESRD rappresenta la sesta causa di morte, e dunque una priorità di salute pubblica globale.

Il trapianto rappresenta l'unico trattamento definitivo per ripristinare la funzionalità renale, ma è limitato dal rischio di rigetto e dai rischi associati alla terapia immunosoppressiva a vita. Inoltre, il trapianto spesso non è fattibile a causa

dalla carenza di organi. Una possibile soluzione potrebbe essere trovata nell'ambito dell'ingegneria dei tessuti, per esempio seminando cellule specifiche su supporti (*scaffold*) con adeguate proprietà fisiche e meccaniche. Tuttavia, l'efficacia di questo approccio non è stata ancora dimostrata. Nel nostro laboratorio, abbiamo sviluppato un modello d'ingegnerizzazione *in vivo*, in cui cellule e tessuti specifici sono impiantati nel linfonodo (LN), un organo linfoide secondario, che agisce da filtro per particelle estranee e cellule tumorali. Il LN è in grado di accogliere un tessuto in via di crescita grazie alla sua innata capacità di espansione. Inoltre, il LN è altamente vascolarizzato. Queste proprietà consentono lo sviluppo di organi funzionali.

IMPATTO

All'interno del LN, abbozzi renali murini e umani maturano in strutture con funzioni escretorie, omeostatiche, ed endocrine, grazie ad un'eccellente vascolarizzazione derivante dall'ambiente ospitante. Tale tecnologia sta aprendo nuove opportunità per modellare lo sviluppo renale e testare il feto di nuove fonti cellulari per l'ingegnerizzazione di tessuti renali. Le cellule staminali pluripotenti sono state utilizzate per la creazione di organoidi renali, tuttavia, con i sistemi *in vitro* comunemente usati, non è possibile rispondere a numerose domande, incluso se questi organoidi (che non possiedono un sistema vascolare) abbiano un fenotipo stabile e fisiologicamente rilevante. I nostri dati dimostrano come il LN si presti bene come nicchia per la maturazione di organoidi renali derivati sia da progenitori dei nefroni murini che da cellule staminali pluripotenti indotte umane. Il sistema vascolare dell'ospite prende contatto con gli organoidi impiantati, rendendo possibile l'ottenimento di nefroni funzionanti all'interno del LN. Il LN può dunque aiutarci a capire quanto i protocolli di differenziazione in uso siano efficaci nel generare tessuti renali funzionanti, e a monitorare, al tempo stesso, che non si sviluppino tessuti indesiderati. Inoltre, l'identificazione dei meccanismi molecolari che regolano la formazione dei nuovi vasi sanguigni nei tessuti/culture renali trapiantati nel LN, può aiutarci a sviluppare nuove strategie per migliorare la vascolarizzazione in costrutti ingegnerizzati.

RISULTATI RAGGIUNTI NEL 2019

Abbiamo dimostrato che la via di trasduzione del segnale mediata da LTβR genera segnali angiogenici che supportano l'organogenesi renale sia nei LN che nell'omento. La nostra ipotesi che LTβR potesse condizionare l'organogenesi renale in questi siti è nata dal ruolo

centrale di LTβR nello sviluppo e omeostasi degli organi linfoidi, così come dalla scoperta che i glomeruli attecchiti nei LN e nell'omento contenevano, durante le fasi precoci di maturazione, cellule endoteliali che esprimevano NIK, un *target* tra tanti, di LTβR. Visto il ruolo di NIK nella vascolarizzazione, e la presenza di cellule endoteliali dell'ospite nel rene trapiantato, abbiamo ipotizzato che il segnale LTβR/NIK in cellule del topo recpiente facilitasse l'organogenesi renale. Come ipotizzato, in mancanza del segnale mediato da LTβR, i reni attecchiti nel LN o nell'omento mostravano un numero ridotto di cellule endoteliali esprimenti NIK, una riduzione della vascolarizzazione/angiogenesi, ed alterazioni strutturali. Tuttavia, l'organogenesi renale non è stata condizionata dall'assenza di NIK. Questo risultato suggerisce o l'esistenza di altri *target* a valle di LTβR in grado di modulare l'angiogenesi, o l'attivazione di vie angiogeniche compensative in assenza di NIK. Infine, altri esperimenti hanno mostrato che l'assenza dei segnali LTβR è in grado di compromettere l'adattamento glomerulare compensativo in risposta alla riduzione della massa renale, indicando che gli approcci di rigenerazione renale, oltre agli approcci di ricostruzione dell'intero rene, potrebbero beneficiare della presenza dei segnali mediati da LTβR.

OBIETTIVI PER IL 2020

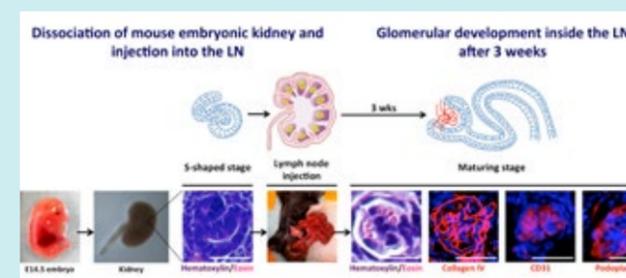
La modulazione dell'organogenesi renale all'interno del LN mediata da LTβR è probabilmente il risultato di processi multicellulari. I segnali mediati da LTβR nelle cellule fibroblastiche reticolari del LN regolano i livelli del fattore di crescita dell'endotelio vascolare (VEGF) e a sua volta, la proliferazione delle cellule endoteliali linfonodali. In maniera simile, l'attivazione di LTβR nelle cellule endoteliali linfonodali controlla lo sviluppo vascolare. Attraverso la delezione cellulo-specifica di LTβR comprenderemo il contributo di ciascuna popolazione stromale all'organogenesi renale. Inoltre, attraverso il trapianto di organoidi renali, che sono privi di cellule immuni ed endoteliali, ci proponiamo di elucidare ulteriormente i meccanismi che modulano l'organogenesi renale nei tessuti linfoidi secondari.

CONFERENZE

POSTER
M. G. Francipane, B. Han, L. Oxburgh, S. Sims-Lucas, Z. Li, E. Lagasse. Bioartificial kidneys: a translational journey. Ri.MED Research Retreat. Palermo, Italy, Oct 23, 2019.

PUBBLICAZIONI

- M. G. Francipane, B. Han and E. Lagasse. Host lymphotoxin-beta receptor signaling is crucial for angiogenesis of metanephric tissue transplanted into lymphoid sites. *The American Journal of Pathology*. 2020 Jan.
- M. G. Francipane, B. Han, L. Oxburgh, S. Sims-Lucas, Z. Li and E. Lagasse. Kidney-in-a-lymph node: a novel organogenesis assay to model human renal development and test nephron progenitor cell fates. *Journal of Tissue Engineering and Regenerative Medicine*. 2019 Sep;13(9):1724-1731.



I linfonodi sono sedi permissive per l'organogenesi renale.
Schema del trapianto di rene embrionale murino allo stadio di "corpi a forma di S" nel LN digiunale. I tessuti renali sono stati isolati da embrioni, frammentati, e iniettati direttamente in un singolo LN. Tre settimane dopo, i topi riceventi sono stati sacrificati ed i LN sono stati isolati ed analizzati istologicamente. I glomeruli in via di maturazione all'interno del LN sono mostrati a seguito di colorazione con ematossilina/eosina, Collagene IV (costituente della matrice mesangiale), CD31 (marcatore dei vasi sanguigni), o Podoplanina (marcatore specifico per i podociti). Blu=Hoechst. Barra=50µm.

OActive - Modelli computazionali avanzati, personalizzati, e multiscala per la prevenzione dell'OsteoArtrosi

Riccardo Gottardi, PhD
rgottardi@fondazionerimed.com

COLLABORAZIONI

- Partner of the European project OActive - H2020: Lead partner: University of Nicosia; other partners on <https://www.oactive.eu/partners/>
- Bioengineering and Biomaterials Laboratory, Children's Hospital of Philadelphia (CHOP), Philadelphia, Stati Uniti
- Dept. of Pediatrics, Perelman School of Medicine, University of Pennsylvania (UPenn), Philadelphia, Stati Uniti
- Dept. of Bioengineering, School of Engineering and Applied Sciences, University of Pennsylvania (UPenn), Philadelphia, Stati Uniti
- Center for Cellular and Molecular Engineering, Dept. of Orthopaedic Surgery, University of Pittsburgh, Philadelphia, Stati Uniti

AREA TERAPEUTICA

Patologie dell'invecchiamento

PIPELINE



BREVE DESCRIZIONE

L'OsteoArtrosi (OA) è una patologia a carico delle articolazioni che interessa la popolazione di media età e di età avanzata. Diversi studi epidemiologici stimano che circa il 27% della popolazione con età maggiore di 65 anni sia affetta da osteoartrosi sintomatica, ed è stato previsto che più di 25 milioni di individui saranno affetti da osteoartrosi entro la fine del 2020. Recenti studi hanno confermato un coinvolgimento dell'intero complesso osteocondrale, che comprende cartilagine ed

osso subcondrale, nella patogenesi dell'osteoartrosi. Il focus del nostro lavoro è quello di determinare il ruolo della porzione ossea subcondrale nello sviluppo della patologia osteoartrosica, studiando i meccanismi biochimici che ne stanno alla base. L'attività sperimentale è stata condotta impiegando tessuti osteocondrali umani mantenuti in condizioni simil-fisiologiche, riprodotte *ex vivo* grazie all'uso di bioreattori tecnologicamente avanzati.

IMPATTO

L'obiettivo della nostra ricerca è quello di studiare l'eziopatogenesi dell'osteoartrosi impiegando un modello osteocondrale *ex vivo* altamente realistico basato su tessuti umani. Il grande vantaggio che deriva dall'impiego di tessuti, è legato alla possibilità di analizzare accuratamente i meccanismi di *crossstalk* tra tessuto cartilagineo ed osseo, e di stabilirne il loro ruolo nello sviluppo della patologia. Questo è possibile grazie all'impiego dei nostri bioreattori bifasici, in grado di assicurare condizioni simil-fisiologiche che mantengono i tessuti vitali anche diverse settimane dopo l'espanto. La piattaforma sviluppata consente di studiare il complesso osteocondrale nella sua interezza, permettendo di mettere in evidenza nuovi meccanismi implicati nello sviluppo dell'osteoartrite. Il nostro approccio apre la via alla scoperta di nuove potenziali prospettive terapeutiche e rappresenta un'evoluzione dei sistemi cellulari *in vitro* comunemente impiegati agli stessi scopi. La possibilità di studiare tessuti umani vitali, riduce inoltre la necessità di impiegare modelli animali ed apre le porte allo sviluppo di una piattaforma di *drug screening*, consentendo di fatto di studiare le proprietà farmacocinetiche di farmaci in un contesto del tutto paragonabile a quello fisiologico.

RISULTATI RAGGIUNTI NEL 2019

Il nostro approccio sperimentale ci ha consentito di determinare e quantificare i mediatori dei processi infiammatori coinvolti nello sviluppo della patologia osteoartrosica, sia nel tessuto cartilagineo che in quello osseo. Inoltre, grazie all'uso di plugs osteocondrali, siamo stati in grado di mettere in risalto i meccanismi di *crossstalk* tra la superficie articolare ed il sottostante strato di tessuto osseo subcondrale. Questo ci ha consentito di delineare un ruolo attivo del tessuto osseo nella produzione di citochine proinfiammatorie quali IL-1 β e IL-6. Tali risultati sono stati possibili grazie all'impiego di tessuti umani osteoartrosici derivanti da scarti chirurgici da

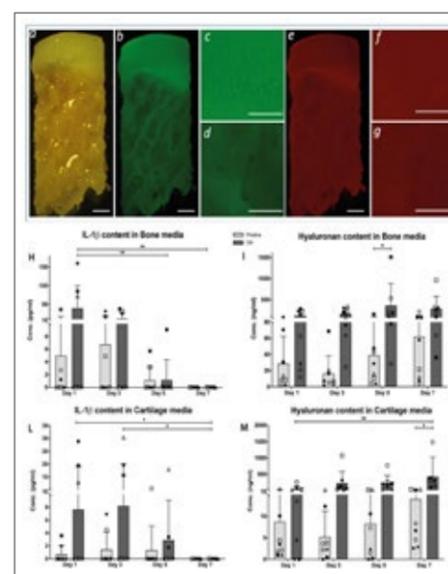


Figura 1: Immagine ottenuta in microscopia in campo chiaro di una plug osteocondrale in sezione longitudinale (a). Immagini ottenute in microscopia a fluorescenza dopo staining Live/Dead che evidenziano popolazioni cellulari vitali (b-d) e morte (e-g). Livelli ossei (H, I) e cartilaginei (L, M) di una citochina proinfiammatoria (IL-1 β) e di un marker degradativo (Hyaluronan) determinati tramite saggi ELISA.

OBIETTIVI PER IL 2020

I risultati ottenuti grazie all'impiego dei nostri sistemi di cultura avanzati, hanno confermato la natura dinamica della patologia osteoartrosica, ponendo l'accento sull'importanza dei fenomeni di *crossstalk* tra tessuto cartilagineo ed osseo. Gli steps successivi che abbiamo previsto, riguardano l'uso di tessuto sinoviale in aggiunta alle *plugs* osteocondrali impiegate finora. Lo scopo ultimo è quello di determinare il ruolo della membrana sinoviale nello sviluppo della patologia osteoartrosica, e di valutarne l'influenza nella produzione di citochine proinfiammatorie e nei fenomeni di *crossstalk*. Contemporaneamente, stiamo identificando potenziali molecole biologicamente attive da testare all'interno del nostro sistema *in vitro*, valutando possibili interazioni tra tessuti. Ciò offrirà ulteriore convalida del sistema a supporto della sua commercializzazione.

CONFERENZE

- Tissue Engineering and Regenerative Medicine - Americas (TERMIS AM), Dicembre 2019, Orlando (FL), USA
- Biofabrication, Ottobre 2019, Columbus (OH), USA
- American Orthopaedic Society for Sports Medicine, AOSSM Annual Meeting, Luglio 2019, Boston (MA), USA
- Tissue Engineering and Regenerative Medicine - EU (TERMIS EU), Maggio 2019, Rodi, Grecia
- CWRU Center for Multimodal Evaluation of Engineered Cartilage, Investigator's Meeting, Maggio 2019, Cleveland (OH), USA
- Orthopaedic Research Society Annual Meeting, Febbraio 2019, Austin (TX), USA

PUBBLICAZIONI

- Iseki T., Rothrauff B.B., Kihara S., Sasakin H., Yoshiya S., Fu H.F., Tuan R.S., Gottardi R. 2019. Dynamic Compressive Loading Improves Cartilage Repair in an In Vitro Model of Microfracture: Comparison of 2 Mechanical Loading Regimens on Simulated Microfracture Based on Fibrin Gel Scaffolds Encapsulating Connective Tissue Progenitor Cells. *The American Journal of Sports Medicine*, 47, 2188-2199 <https://doi.org/10.1177/0363546519855645>
- Chiesa I., De Maria C., Lapomarda A., Fortunato G.M., Montemurro F., Di Gesù R., Tuan R.S., Vozzi G., Gottardi R. 2019. Endothelial cells support osteogenesis in an in vitro vascularized bone model developed by 3D bioprinting. *Biofabrication*. <https://doi.org/10.1088/1758-5090/ab6a1d>. IN PRESS

PROPRIETÀ INTELLETTUALE

- US20160201037A1, 22-08-2013, Modular, microfluidic, mechanically active bioreactor for 3d, multi-tissue, tissue culture
- US20190276784A1, 17-11-2017, Organ chip to model mammalian joint

PRODOTTI: **ATMP** (Advanced Therapy Medicinal Products)

Linfociti T multi-virus specifici per il trattamento delle infezioni virali post trapianto

Monica Miele, PhD
mmiele@fondazionerimed.com

 **COLLABORAZIONI**
IRCCS ISMETT, Palermo, Italia

 **AREA TERAPEUTICA**
Insufficienze d'organo



IMPATTO

I processi infettivi, in particolare causati da agenti virali, costituiscono la causa principale di morbilità e mortalità post-trapianto. Fino al 75% dei pazienti trapiantati sviluppa infezioni nel corso del primo anno post-trapianto.

La causa primaria del fenomeno è riconducibile all'inibizione della risposta immune cellulo-mediata virus-specifica indotta dai farmaci immunosoppressori utilizzati per la prevenzione del rigetto. Poiché le cellule T giocano un ruolo chiave nel controllo e nella clearance delle infezioni virali, lo stato di immunodepressione facilita casi di infezione primaria, reinfezione o riattivazione di agenti virali ad elevata prevalenza, quali ad esempio i virus erpetici (es. EBV, CMV e HHV-8), con possibile sviluppo di patologie sistemiche o di organo. Il trattamento di queste infezioni presenta problematiche rilevanti sia per la scarsità dei farmaci antivirali utilizzabili sia per la loro tossicità. Una possibilità alternativa, ormai validata clinicamente, è rappresentata dai linfociti T virus-specifici, come prodotto Medicinale di Terapia Avanzata (ATMP), in modo da permettere al paziente di sviluppare *in vivo* una risposta citotossica nei confronti delle cellule infettate: risposta efficace sia come profilassi sia come terapia di manifestazioni patologiche virus-indotte potenzialmente letali per il paziente.

RISULTATI RAGGIUNTI NEL 2019

Le attività condotte nel 2019 hanno permesso di ottimizzare il protocollo di produzione di linfociti T multivirus specifici, con maggiore attenzione rivolta verso lo sviluppo di cellule T HHV-8 specifiche. È stato aumentato il numero di linee

cellulari prodotte sia da donatrici di sangue cordonale che da donatori sani adulti. Il protocollo di produzione dei linfociti T multivirus specifici definitivo non richiederà l'utilizzo di cellule dendritiche, cellule presentanti l'antigene professionali, poiché è stato dimostrato, grazie agli esperimenti condotti finora, che i monociti/linfociti B contenuti nelle cellule (PBMC) isolate dal sangue dei donatori sani adulti sono ugualmente in grado di stimolare la proliferazione e attivare una efficace risposta citotossica, *in vitro*, virus-specifica dei linfociti T prodotti. L'ottenimento delle linee T HHV-8 specifiche si è dimostrato più difficile da realizzare, pur testando diverse condizioni di coltura, il prodotto cellulare finale non ha soddisfatto i test di attività/specificità richiesti. A tal fine è stata condotta un'analisi *in silico* di proteine dell'HHV-8 al fine di identificare altre miscele di peptidi virali (9-11 aa) più piccoli rispetto a quelli utilizzati in precedenza) e ristretti per HLA-E e gli HLA di I classe più frequenti nella nostra popolazione

OBIETTIVI PER IL 2020

Durante il 2020 sarà testato il metodo di produzione dei linfociti T multivirus tramite l'utilizzo di innovativi "device" per colture cellulari in sospensione al fine di aumentare il numero delle cellule prodotte da ciascun donatore minimizzando la manipolazione delle stesse. Inoltre saranno condotti esperimenti con le nuove miscele di peptidi del virus dell'HHV-8 al fine di ottenere linfociti T HHV-8 specifici che saranno caratterizzati, a differenti time points, dal punto di vista immunofenotipico, per l'attività citotossica virus specifica *in vitro* e per il rilascio nel mezzo di coltura di alcune molecole fondamentali per il mantenimento della risposta cellulo-mediata *in vivo* (es. IFN- γ).



BREVE DESCRIZIONE

L'infusione di linfociti T virus specifici rappresenta una valida e alternativa strategia terapeutica ai farmaci antivirali convenzionali per il trattamento delle complicanze virus-relate nei pazienti trapiantati d'organo. Al fine di aumentare le potenzialità cliniche di questa immunoterapia cellulare stiamo sviluppando nei nostri laboratori di ricerca approcci innovativi per generare e selezionare dei cloni T multi-virus specifici.

I cloni di linfociti T, generati da campioni di sangue di donatori sani, sono attivati *in vitro* contro il virus di Epstein-

Barr (EBV), il Citomegalovirus (CMV), Adenovirus (ADV), BK Poliomavirus (BKV) e Herpesvirus-8 (HHV-8) attraverso l'utilizzo di miscele di peptidi virali immunodominanti e interleuchine.

Inoltre la creazione di una banca di linfociti T multi-virus specifici eterologhi garantisce la disponibilità di un prodotto "pronto all'uso", cioè cellule derivate da un donatore compatibile in termine di istocompatibilità maggiore HLA, da somministrare al paziente al momento della diagnosi di una complicanza post-trapianto virus-relata.

PRODOTTI: **ATMP** (Advanced Therapy Medicinal Products)

Studio di cellule mesenchimali stromali da placenta umana per applicazioni in medicina rigenerativa e possibili terapie epatiche

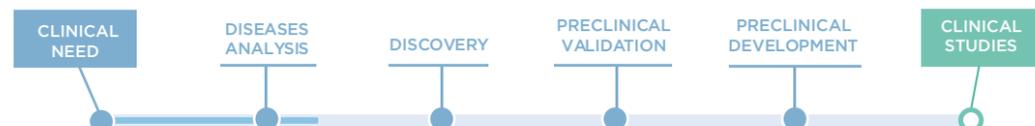
Mariangela Pampalone
mpampalone@fondazionerimed.com

 **COLLABORAZIONI**
IRCCS ISMETT Palermo, Italia

 **AREA TERAPEUTICA**
Insufficienze d'organo

 **IMPATTO**

PIPELINE

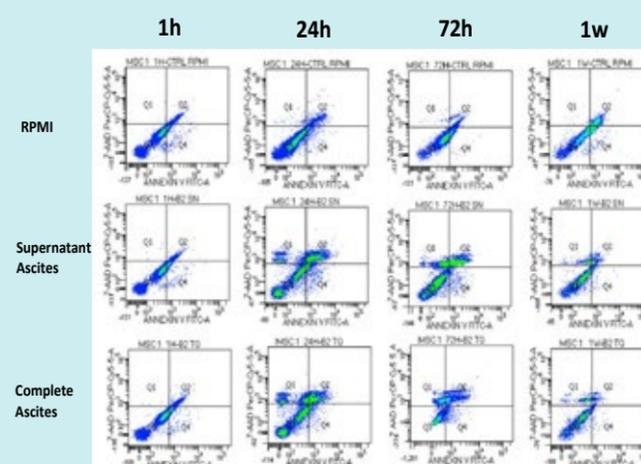


 **BREVE DESCRIZIONE**

I pazienti con cirrosi epatica presentano un aumentato rischio di sviluppare insufficienza multiorgano a causa di infezioni causate da traslocazione batterica causata dal passaggio di batteri e dei loro prodotti, come le endotossine, dal lume alla parete intestinale e dai linfonodi mesenterici al torrente circolatorio. I batteri e i loro prodotti sono in grado di attivare il sistema immunitario con aumento del rilascio di mediatori in grado di indurre la sindrome da risposta infiammatoria sistemica (SIRS) la cui progressione culmina nell'insufficienza multiorgano (MOF). Sia le endotossine sia le citochine possono causare necrosi epatocitaria attraverso alterazioni della microcircolazione epatica. Un ruolo fondamentale in questo tipo di danno epatico è rivestito

to dalle cellule del Kupffer, che sono fonte di specie altamente reattive dell'O₂ e dell'NO in grado di determinare perossidazione lipidica e danno epatico. Le alterazioni funzionali delle difese batteriche dell'immunità umorale aspecifica e cellulo-mediata, facilitano l'attecchimento di infezioni nelle varie sedi, incluso il liquido ascitico.

Fig.1: Representative panel of FC analyses showing how hA-MSCs were able to respond to AF exposure reducing apoptosis and necrosis at 1w suggesting a resistance to the stress (revealed at 24 and 72h), also compared with cells grown in RPMI



 **RISULTATI RAGGIUNTI NEL 2019**

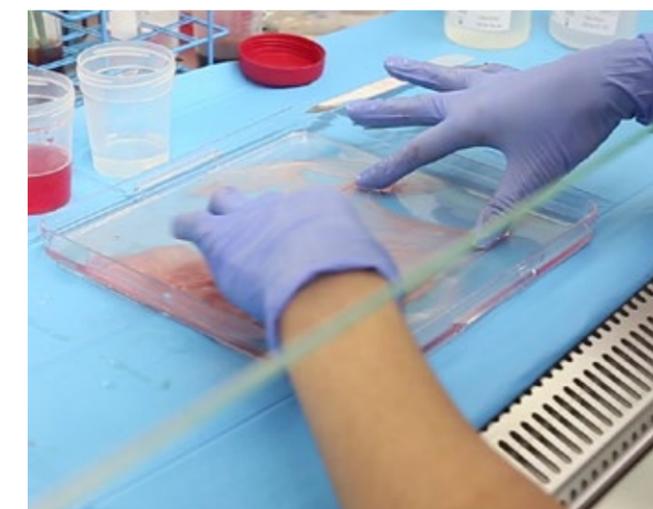
Sono stati condotti studi *in vitro* per valutare l'effetto del liquido ascitico proveniente da 3 pazienti cirrotici (Child-Turcotte-Pugh B) sottoposti a paracentesi su 3 diversi lotti di cellule mesenchimali amniotiche (hA-MSCs) a diversi tempi. I risultati ottenuti hanno dimostrato che le cellule a contatto con il fluido ascitico non presentano variazioni morfologiche, inibizioni alla proliferazione, variazioni fenotipiche né valori di necrosi/apoptosi significativi.

 **OBIETTIVI PER IL 2020**

Studio dei mezzi condizionati per la valutazione delle citochine pro ed antiinfiammatorie rilasciate e successivo studio della componente macrofagica isolata dal liquido ascitico al fine di valutarne la variazione dello stato M1 o M2-like in seguito a co-coltura con hA-MSCs.

 **PUBBLICAZIONI**

- Comparison of Immunosuppressive and Angiogenic Properties of Human Amnion-derived Mesenchymal Stem Cells between 2D and 3D Culture Systems. Vitale Miceli; **Mariangela Pampalone**; Serena Vella; Anna Paola Carreca; Giandomenico Amico; and Pier Giulio Conaldi. Stem Cells Int. 2019 Feb 18;2019:7486279.
- Comparative study of the production of soluble factors in human placental derived mesenchymal stromal/stem cells grown in adherent conditions or as aggregates in a catheter-like device. Miceli V., Chinnici CM., Bulati M., **Pampalone M.**, Amico G., Schmelzer E., Gerlach JC., Conaldi PG. Biochem Biophys Res Commun. 2019 Nov 19. pii: S0006-291X(19)32189-8



iRhom2: un nuovo target terapeutico in osteoartrosi?

Simone Dario Scilabra, PhD
sdscilabra@fondazionerimed.com

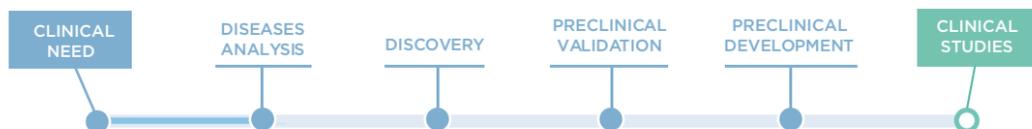
COLLABORAZIONI

- Institute of Aging and Chronic Diseases, University of Liverpool, Liverpool, Regno Unito
- The William Harvey Research Institute, Queen Mary University of London, Londra, Regno Unito
- Pharmacy Department, Università di Pisa, Pisa, Italia
- German Center for Neurodegenerative Diseases (DZNE), Monaco, Germania

AREA TERAPEUTICA

Patologie dell'invecchiamento

PIPELINE



BREVE DESCRIZIONE

L'osteartrosi (OA) è una patologia debilitante che causa dolore articolare. Dal punto di vista molecolare, l'OA è caratterizzata da degradazione della cartilagine articolare a causa dell'attività aberrante di due classi di metalloproteasi, le MMPs e ADAMTSs. Il recettore endocitico LRP1 controlla il turnover di queste proteasi, per cui la sua inattivazione a seguito di "shedding" proteolitico contribuisce alla progressione della malattia. La citochina proinfiammatoria TNF svolge un ruolo critico nell'OA, in quanto induce un aumento dell'espressione delle metalloproteasi. Analogamente a LRP-1, il TNF viene processato, e quindi attivato, da ADAM17. È chiaro come l'inibizione di ADAM17 possa bloccare

la progressione dell'OA prevenendo lo spegnimento di LRP-1 e l'attivazione di TNF. Tuttavia, ADAM17 rilascia più di 80 proteine diverse e, di conseguenza, la sua inibizione completa porta alla deregolazione di tutte queste proteine e alla potenziale insorgenza di gravi effetti collaterali. iRhom1 e iRhom2 sono regolatori essenziali di ADAM17, in quanto guidano la sua maturazione e attività proteolitica. Usando "unbiased proteomics" abbiamo scoperto che il rilascio di TNF e LRP-1 è mediato da ADAM17 solo quando la proteasi è in complesso con iRhom2, ma non iRhom1. Pertanto, l'inibizione farmacologica di iRhom2 può essere protettiva nell'OA, con bassi rischi di effetti collaterali.

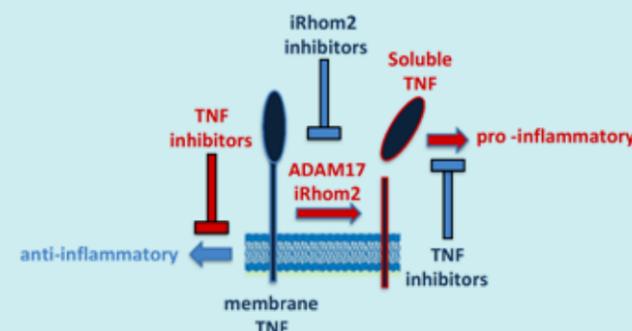
IMPATTO

Il progetto proposto si prefigge di esaminare il ruolo di iRhom2 nel contesto dell'OA. iRhom2 guida il traffico molecolare e la maturazione di ADAM17, una proteasi con un ruolo cruciale nello sviluppo e nell'infiammazione. Sebbene basato su solidi dati proteomici, il progetto è altamente innovativo. Innanzitutto, il progetto mira allo sviluppo di una nuova terapia per l'OA. Infatti, questo studio prevede di generare una molecola che sia in grado di bloccare la funzione di iRhom2 e quindi il rilascio di TNF e l'inattivazione di LRP-1.

Inoltre, il ruolo negativo di TNF e iRhom2 nella patogenesi di malattie infiammatorie e neurodegenerative, come l'artrite reumatoide e l'Alzheimer, è già stato dimostrato, e l'inibitore che vogliamo sviluppare può trovare applicazioni nella terapia di queste malattie. Recentemente è emerso che iRhom2 e il suo omologo iRhom1 possono dirigere l'attività ADAM17 verso substrati specifici, ma questo campo di ricerca è ancora agli inizi. Il nostro studio prevede un'analisi completa di quelle proteine che vengono processate da ADAM17, in modo iRhom1- o iRhom2-dipendente. Pertanto, questo studio fornirà ulteriori approfondimenti sulla biologia degli iRhom, rivelando nuove proprietà funzionali e strutturali di queste proteine e il meccanismo con cui regolano la selettività di ADAM17

RISULTATI RAGGIUNTI NEL 2019

Sebbene il progetto sia appena iniziato, sono già stati raggiunti una serie di risultati fondamentali. Innanzitutto, abbiamo istituito tutte le collaborazioni necessarie per realizzare lo studio. Ciò comprende una collaborazione con George Bou-Gharios presso l'Università di Liverpool, che analizzerà la progressione OA nei topi knockout per iRhom2, e con Ahuva Nissim presso la Queen Mary University di Londra, che ha sviluppato una delle più grandi librerie per phage-display attualmente disponibili e ci aiuterà con lo sviluppo di un anticorpo per iRhom2 che



Genetic ablation of iRhom2 leads to inactivation of ADAM17 in immune cells. As a consequence, the membrane-tethered TNF, which has anti-inflammatory properties, cannot be converted in soluble TNF, which is a pro-inflammatory cytokine. This suggests that iRhom2 inhibitors may be more efficient than anti-TNF inhibitors, which block both membrane-tethered and soluble TNF, in the therapy of inflammatory diseases.

potrebbe essere utilizzato nella terapia dell'OA. In secondo luogo, abbiamo assunto Matteo Calligaris, uno studente dell'Università di Udine, che porterà avanti il progetto. Inoltre, abbiamo avviato una collaborazione con l'Università di Pisa, al fine di consentire a Matteo Calligaris di iscriversi al programma di dottorato sotto la supervisione accademica di Armando Rossello ed Elisa Nuti, due dei più importanti scienziati italiani nel campo delle metalloproteasi. Infine, abbiamo completato l'MTA con la University Health Network (UHN, Toronto, Canada) per l'uso del topo transgenico knockout per iRhom2.

OBIETTIVI PER IL 2020

Abbiamo recentemente trasferito i topi knockout per iRhom2 all'Università di Liverpool, dove verrà valutata la progressione dell'OA in un modello chirurgico della malattia. Ci aspettiamo che la delezione di iRhom2 migliorerà la progressione della malattia riducendo lo spegnimento di LRP-1 e i livelli extracellulari di MMP-13, ADAMTS-4 e ADAMTS-5. Inoltre, useremo la proteomica per analizzare la cartilagine dei topi con OA. Questo studio fornirà informazioni interessanti sulle alterazioni nel bilancio dei fattori catabolici/anabolici della matrice extracellulare, e quindi sui potenziali pathway molecolari regolati da iRhom2 che inducono l'OA. Potenzialmente, questo studio potrebbe identificare nuovi meccanismi, oltre al turnover della metalloproteasi, che possono essere coinvolti nella patogenesi dell'OA e quindi nuovi target farmacologici. Infine, qualora l'inattivazione di iRhom2 portasse ad un miglioramento della malattia, progettiamo di brevettare al più presto iRhom2 come target terapeutico.

CONFERENZE

- British Society for Matrix Biology (BSMB) Autumn Meeting, University of East Anglia, Norwich, UK (Presentazione Orale).
- Gordon Research Conference (GRC) in metalloproteinases, Il Ciocco Resort, Lucca (Italia) (Presentazione Poster).

PUBBLICAZIONI

- Anna P. Carreca, Veronica Pravatà, Gillian Murphy, Hideaki Nagase, Linda Troeberg, Simone D. Scilabra. TIMP-3 facilitates binding of target metalloproteinases to the endocytic receptor LRP-1 and promotes scavenging of MMP-1. BiorXiv doi: <https://doi.org/10.1101/2019.12.23.886762>
- Yang, C.Y., L. Troeberg, and S.D. Scilabra, Quantitative Mass Spectrometry-Based Secretome Analysis as a Tool to Investigate Metalloprotease and TIMP Activity. Methods Mol Biol, 2020. 2043: p. 265-273.

iRhom2 regola i livelli delle molecole MHC di classe I e risposte immunitarie

Simone Dario Scilabra, PhD
sdscilabra@fondazionerimed.com

COLLABORAZIONI

- German Center for Neurodegenerative Diseases (DZNE), Monaco, Germania
- Weill Cornell Medicine Graduate School of Medical Sciences, New York, Stati Uniti

AREA TERAPEUTICA

Cancro

PIPELINE



BREVE DESCRIZIONE

L'immunoterapia dei tumori è recentemente emersa come una tipologia di trattamento per il cancro molto promettente. Diversi approcci immunoterapici vengono ad oggi utilizzati per stimolare il sistema immunitario a combattere le cellule tumorali e altri sono tuttora in via di sviluppo. Le molecole del complesso maggiore di istocompatibilità (MHC) hanno un ruolo cruciale nella progressione tumorale in quanto presentano gli antigeni tumorali ai linfociti T citotossici e alle cellule *natural killers* (NKs). Purtroppo, sebbene linfociti e NKs svolgano una funzione protettiva nei confronti dei tumori, le cellule tumorali hanno sviluppato una serie di meccanismi per evadere l'attività di immunosorveglianza mediata da tali cellule. iRhom1 e 2 sono dei regolatori essenziali di ADAM17, l'enzima

responsabile della produzione della citochina TNF. Oltre a supportare la maturazione e l'attività dell'enzima, i nostri studi dimostrano che gli iRhoms sono coinvolti anche nella regolazione dei livelli di MHC di classe I. L'ablazione genetica di iRhom2 in fibroblasti murini rende queste cellule non responsive alle cellule NK, indicando che l'inattivazione di iRhom2 ha una chiara conseguenza funzionale sull'attivazione delle cellule NK. Questa regolazione avviene a livello post-traduzionale, essendo i trascritti di MHC I uguali sia nelle cellule *wild type* sia nelle cellule che non esprimono iRhom2. L'obiettivo principale di questo progetto è di elucidare i meccanismi molecolari con cui gli iRhoms regolano i livelli di molecole MHC di classe I.

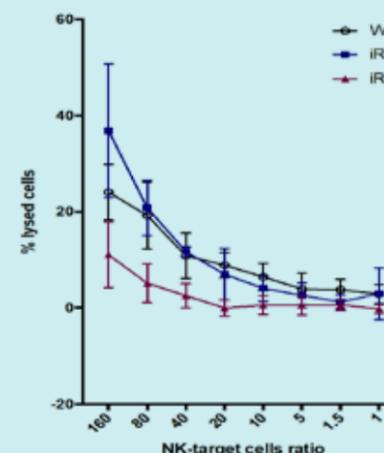
IMPATTO

Gli iRhoms sono stati identificati per la prima volta come regolatori di ADAM17, una proteasi che, per la sua capacità di convertire il TNF da "proteina di membrana" a citochina solubile, gioca un ruolo fondamentale nelle risposte immunitarie e in una serie di altri processi biologici. Più recentemente sono state scoperte alcune funzioni degli iRhoms non correlate alla regolazione di ADAM17, a dimostrazione che ciò che attualmente conosciamo degli iRhoms è minimale e che la biologia di queste proteine è molto più complessa di quanto inizialmente si potesse credere.

I nostri risultati inequivocabilmente mostrano una connessione tra gli iRhoms e le molecole MHC di classe I, proteine fondamentali nelle risposte immunitarie in quanto capaci di esporre gli antigeni peptidici per il riconoscimento e l'attivazione delle cellule immunitarie. Noi ipotizziamo che gli iRhoms controllino i livelli superficiali delle molecole di classe I attraverso un meccanismo molecolare simile a quello con cui controllano la maturazione di ADAM17. È chiaro, quindi, come questa ricerca possa contribuire a incrementare la nostra conoscenza su queste affascinanti proteine e della loro funzione nell'immunità. Inoltre, risulta evidente come questo studio possa avere una forte componente traslazionale, in quanto può porre le basi per nuovi approcci immunoterapici per quei tumori che non hanno ancora una terapia, o per limitare gli eventi di rigetto nei trapianti.

RISULTATI RAGGIUNTI NEL 2019

Sebbene questo progetto sia ancora ai suoi inizi, sono già stati ottenuti una serie di risultati fondamentali per il suo avanzamento. In aggiunta ai risultati preliminari che stanno alla base di questo progetto e che sono descritti nel precedente paragrafo, nel 2019 abbiamo avviato una serie di collaborazioni e completato alcune misure necessarie per portare avanti il progetto in maniera positiva. Innanzitutto, abbiamo formalizzato il "Material Transfer Agreement" (MTA) con



Genetic deletion of iRhom2 in target cells decreases their natural killers-mediated lysis. WT, iRhom1 KO or iRhom2 KO mouse embryo fibroblasts were radiolabeled with ⁵¹Chromium and incubated with serial dilutions of natural killers (NKs, 160-1:1). NKs-mediated cell lysis was measured by ⁵¹Chromium release.

l'University Health Network (UHN, Toronto, Canada) per poter utilizzare un modello murino in cui iRhom2 è geneticamente inattivato. Questo topo transgenico ci servirà per gli esperimenti di trapianti *in vivo* e per isolare cellule immuni primarie che mancano di iRhom2. Poter isolare queste cellule è assolutamente fondamentale per raggiungere gli obiettivi che ci siamo prefissati per questo progetto. Inoltre abbiamo messo in piedi una serie di collaborazioni, tra cui quella con Carl Blobel, professore alla Weill Cornell University di New York e Stefan Lichtenthaler del DZNE Munich, due ricercatori tra i massimi esperti mondiali nel campo degli iRhoms, che ci hanno permesso di ricevere materiali e reagenti che sono necessari per portare avanti il progetto in maniera proficua, tra cui costrutti per l'espressione ectopica degli iRhoms e anticorpi per il loro riconoscimento in "Western blotting".

OBIETTIVI PER IL 2020

Dal punto di vista scientifico, l'obiettivo principale di questo progetto è capire le basi molecolari della regolazione delle molecole MHC di classe I mediata dagli iRhoms. Per fare ciò, abbiamo pianificato di inattivare geneticamente iRhom1 e iRhom2 in una serie di specifiche linee cellulari tumorali utilizzando la tecnologia CRISPR-Cas9, e di analizzare il traffico cellulare delle molecole MHC di classe I in tali linee cellulari. Inoltre, abbiamo in mente di studiare le conseguenze funzionali di tale regolazione nell'attivazione dei linfociti T citotossici (CTL) e delle cellule natural killers (NKs). Cellule CTL e NK verranno messe in coltura con cellule tumorali in cui iRhom1 o iRhom2 sono deleti, e l'attivazione di queste cellule immunitarie verrà analizzata utilizzando metodi tradizionali, come la marcatura cellulare con cromo radioattivo e il successivo rilascio a seguito di lisi cellulare. Inoltre, vogliamo definire un approccio proteomico per studiare gli effetti dell'inattivazione di iRhom1 e iRhom2 nelle cellule tumorali sul secretoma di cellule NK e CTL. Questa metodologia proteomico si basa sulla tecnica SPECS ("secretome protein enrichment with click sugars", Khun et al., EMBO J, 2012), precedentemente messa a punto dal laboratorio di Stefan Lichtenthaler al DZNE di Monaco di Baviera. La SPECS prevede di marcare metabolicamente le cellule con azido-zuccheri che vengono incorporati nelle glicoproteine (e quindi le proteine di membrana e secrete) e che possono essere purificate grazie ad una reazione di "click-chemistry". In questa maniera, marcando metabolicamente le cellule effettrici, NK o CTL, si potranno isolare le proteine da loro rilasciate, separandole da quelle delle cellule *target*.

CONFERENZE

British Society for Matrix Biology (BSMB) Autumn Meeting, University of East Anglia, Norwich, UK (Presentazione Orale).

Gordon Research Conference (GRC) in metalloproteinases, Il Ciocco Resort, Lucca (Italia) (Presentazione Poster).



INGEGNERIA DEI TESSUTI E DISPOSITIVI MEDICI

I ricercatori della Fondazione Ri.MED, in stretta collaborazione con partner clinici, sono impegnati nella simulazione dei sistemi fisiologici, lo studio dei biomateriali e dei tessuti ingegnerizzati, e lo sviluppo di nuove soluzioni terapeutiche su questi basati.

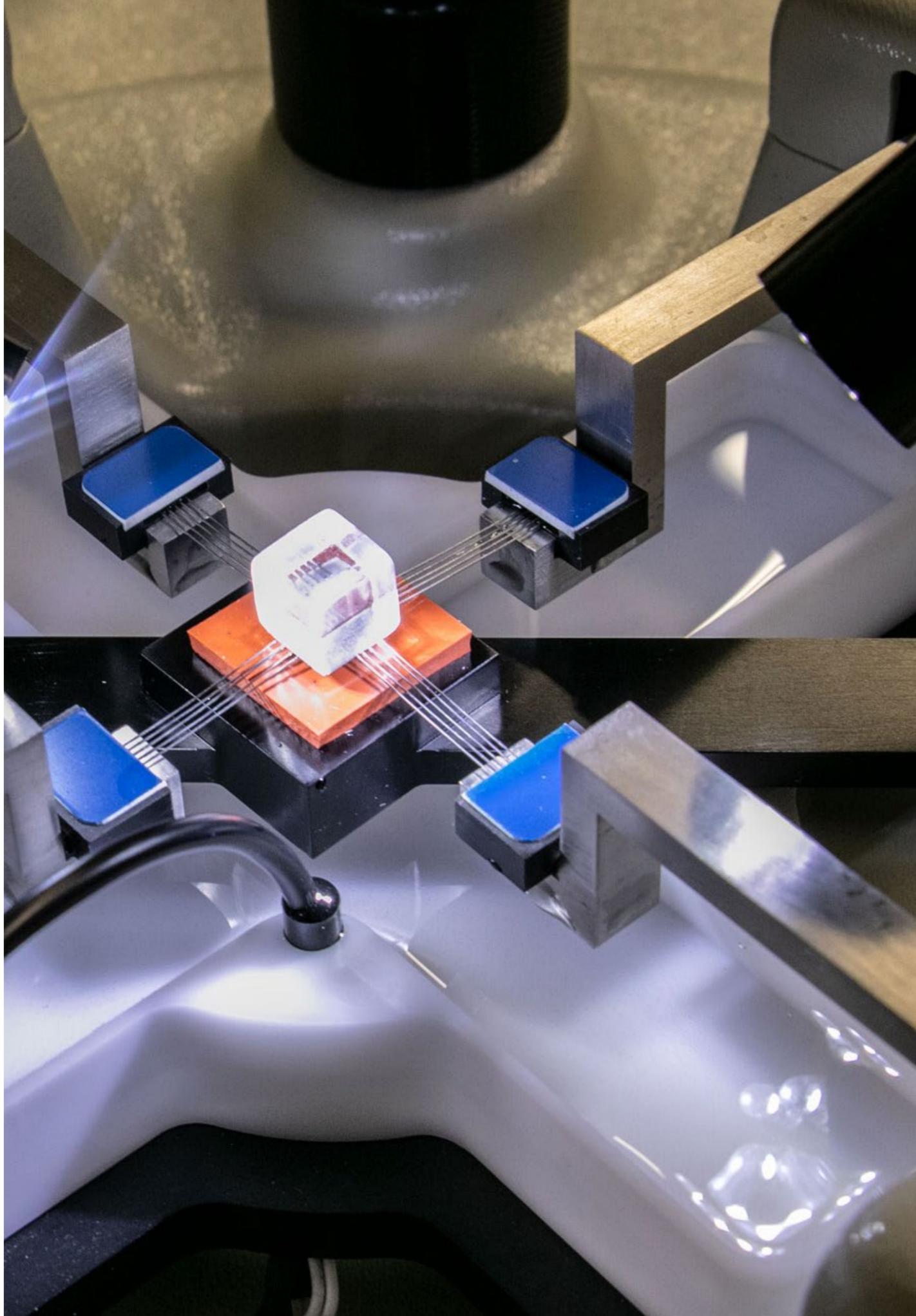
La strumentazione in dotazione ai nostri ricercatori consente l'ottimizzazione di biomateriali e tessuti ingegnerizzati per le diverse applicazioni. Ne permette inoltre l'impiego nella progettazione, sviluppo e validazione preclinica di organi e dispositivi impiantabili di nuova generazione, in particolare nell'ambito cardiovascolare.

Nel corso del 2019, la nostra ricerca in questi ambiti ha prodotto progressi rilevanti, sia a livello di ricerca di base, che nelle applicazioni dirette verso il paziente.

Sono stati investigati nuovi approcci per la caratterizzazione di tessuti biologici e biomateriali, e per la fabbricazione di *scaffold*.

Si è acquisita una maggiore comprensione dei meccanismi biologici e fisiologici responsabili per l'adesione in ambienti umidi, per la proliferazione cellulare e per gli eventi tromboembolici. Inoltre, sono stati condotti importanti sviluppi nella valutazione preclinica, *in vitro* ed *in vivo*, di soluzioni cardiovascolari innovative, che includono *patch* cardiaci ingegnerizzati e nuove valvole cardiache realizzate mediante polimeri biostabili, tessuti ingegnerizzati o applicazioni di ingegneria genetica.

La possibilità di sviluppo e validazione *in house* di soluzioni cliniche, unitamente alla collaborazione con i maggiori centri clinici nel territorio, faciliterà l'introduzione di tali trattamenti offrendo al contempo nuovi strumenti di supporto nella pianificazione terapeutica e nel processo decisionale pre-intervento.



Sviluppo di bio-adesivi per ambienti acquosi

Caterina Alfano, PhD

Sviluppo di una valvola cardiaca transcateretere innovativa

Gaetano Burriesci, PhD

Sviluppo di una valvola cardiaca in tessuto animale priva di Alfa-Gal

Gaetano Burriesci, PhD

Analisi dell'appendice atriale sinistra per la predizione del rischio di trombosi

Gaetano Burriesci, PhD

Analisi idrodinamica della valvola aortica in condizioni ottimali ed alterate

Gaetano Burriesci, PhD

Caratterizzazione termomeccanica di biomateriali superelastici Ni-Ti

Gaetano Burriesci, PhD

Bioreattori per l'elaborazione e deposizione di matrice extra-cellulare (BE-ECM)

Antonio D'Amore, PhD

Modelli numerici per la meccanica e la crescita tissutale di tessuti nativi ed ingegnerizzati (NET-MTG)

Antonio D'Amore, PhD

Analisi strutturale ed istopatologica per immagini di tessuti nativi ed ingegnerizzati (NET-IBA)

Antonio D'Amore, PhD

Parete di miocardio ingegnerizzata (TECP)

Antonio D'Amore, PhD

Valvole cardiache ingegnerizzate (TEHV)

Antonio D'Amore, PhD

Vasi sanguigni ingegnerizzati (TEVG)

Antonio D'Amore, PhD

R-CaRe - Riabilitazione per la rigenerazione della Cartilagine

Riccardo Gottardi, PhD

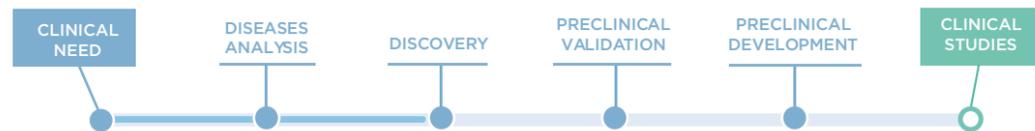
Sviluppo di bio-adesivi per ambienti acquosi

Caterina Alfano, PhD
calfano@fondazionerimed.com

COLLABORAZIONI

- UK Dementia Research Institute (UK DRI) - King's College London, Londra, Regno Unito
- Istituto di Biofisica (IBF) - CNR, Palermo, Italia

PIPELINE



BREVE DESCRIZIONE

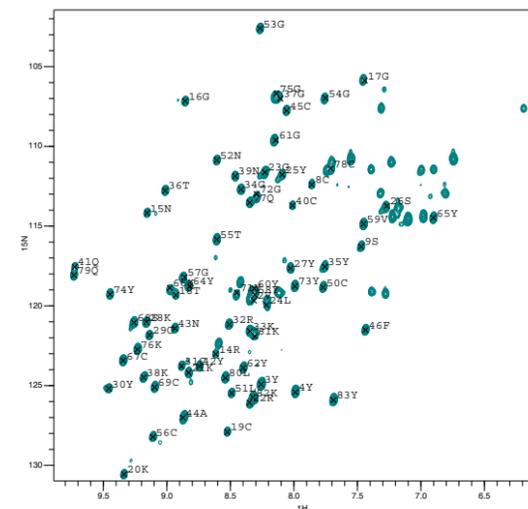
Gli animali sessili marini hanno sviluppato strategie adattive per superare gli ostacoli che inibiscono la loro adesione a superfici solide in ambiente acquoso (pH, strati di idratazione e proprietà dielettriche). Ciò ha reso questi animali potenziali fonti di adesivi biocompatibili non tossici che hanno l'ulteriore vantaggio di funzionare in ambienti acquosi. Queste proprietà di adesione, forti e insolubili in acqua, hanno attirato un crescente interesse per potenziali applicazioni in chirurgia, medicina rigenerativa, biotecnologia e scienza dei materiali. In particolare, le cozze hanno ricevuto un'attenzione significativa soprattutto grazie alla loro capacità di aderire

fortemente ai loro substrati per resistere anche a condizioni di marea turbolente. L'adesione del mitilo è possibile attraverso la secrezione di un holdfast a base proteica (bisso), composto chimicamente da proteine che maturano nel piede del mitilo (mussel foot proteins, mfps). Tre mfps sono state recentemente identificate nel piede della cozza verde asiatica *Perna viridis*: Pvfp-3a, Pvfp-5β e Pvfp-6.

Il nostro obiettivo è quello di caratterizzare strutturalmente queste proteine e derivare proteine ricombinanti biocompatibili con proprietà adesive.

IMPATTO

Lo sviluppo di nuovi adesivi di derivazione naturale ha un grande impatto in settori quali l'ingegneria dei tessuti, l'impianto di dispositivi medici e la chiusura di ferite. Infatti, ci sono situazioni in cui tecniche più tradizionali come la sutura sono impraticabili e l'uso di adesivi diventa particolarmente cruciale. La grande sfida nello sviluppo di nuove molecole bioadesive è quella di trovare molecole in grado di lavorare in ambienti acquosi e ostili e in grado di far aderire tessuti in modo efficiente in tali condizioni. Lo sviluppo di proteine ricombinanti ispirate da quelle di animali sessili con proprietà adesive in acqua, potrebbe superare queste difficoltà. Tali proteine hanno anche l'attraente proprietà di essere biodegradabili, non tossiche per il corpo umano e non suscitano facilmente una forte risposta immunitaria.



Assigned ¹⁵N-HSQC NMR spectrum of Pvfp5β. The peaks result well dispersed as expected for a folded and non-aggregated protein.

RISULTATI RAGGIUNTI NEL 2019

Studi recenti hanno dimostrato che, tra le tre mfps recentemente identificati nella cozza asiatica *Perna viridis*, la proteina di tipo 5β (Pvfp-5β) viene secreta per prima e quindi si è ipotizzato che questa proteina sia la prima ad avviare l'interazione con il substrato marino. Noi abbiamo eseguito la prima produzione di Pvfp-5β ricombinante e la sua caratterizzazione mediante dicroismo circolare (CD), risonanza magnetica nucleare (NMR) e Dynamic Light Scattering (DLS). I nostri studi biofisici confermano che la proteina è foldata e presenta sia β-sheet che strutture random coil. Abbiamo inoltre dimostrato che Pvfp-5β ricombinante ha proprietà adesive anche nella sua forma non legata alla Dopamina e non mostra citotossicità per le cellule come richiesto per un biomateriale. I nostri risultati dimostrano per la prima volta che Pvfp-5β ricombinante potrebbe essere un buon candidato per lo sviluppo di adesivi biocompatibili.

OBIETTIVI PER IL 2020

Grazie alla messa a punto di un protocollo per la produzione di Pvfp-5β ricombinante, siamo in grado di produrre adeguate quantità di proteina senza ricorrere alla difficoltosa purificazione direttamente dalla cozza. Questo ci consente anche di ottenere la proteina con e senza modifiche post-traduzionali e di confrontare le proprietà adesive delle due forme. Attualmente stiamo risolvendo la struttura tridimensionale di Pvfp-5β nella sua forma non Dopaminata mediante risonanza magnetica nucleare. Successivamente intendiamo effettuare un confronto dettagliato delle proprietà della proteina con e senza modifiche post-traduzionali, al fine di raggiungere una migliore comprensione della chimica alla base dell'interazione delle Pvfps con la superficie marina. Saranno inoltre testate la biodegradabilità e le proprietà meccaniche di Pvfp-5β.

MEETINGS

- XLVIII National Congress on Magnetic Resonance, september, 2019, L'Aquila (Italy)
- Resonance in Biology, september, 2019, Pavia (Italy)

PUBLICATIONS

- Santonocito R., Venturella F., Dal Piaz F., Morando M.A., Provenzano A., Rao E., Costa M., Bulone D., San Biagio P.L., Giacomazza D., Sicorello A., Alfano C., Passantino R., Pastore A. (2019) Recombinant mussel protein Pvfp-5β: a potential tissue bioadhesive. *J Biol Chem.* 294(34):12826-12835. *Co-corresponding authors.
- Fricano A., Librizzi F., Rao E., Alfano C., Vetri V. (2019) Blue autofluorescence in protein aggregates "lighted on" by UV induced oxidation. *BBA - Proteins and Proteomics* 1867(11):140258.
- Zacco E., Graña-Montes R., Martin S.R., de Groot N.S., Alfano C., Tartaglia G.G., Pastore A. (2019) RNA as a key factor in driving or preventing self-assembly of the TAR DNA-binding protein 43. *J Mol Biol.* 431(8):1671-1688.

Sviluppo di una valvola cardiaca transcateretere innovativa

Gaetano Burriesci, PhD
gburriesci@fondazionerimed.com



COLLABORAZIONI

- University College London (UCL), Londra, Regno Unito
- Barts Heart Centre, Londra, Regno Unito

AREA TERAPEUTICA

- Insufficienze d'organo
- Patologie dell'invecchiamento

PIPELINE



BREVE DESCRIZIONE

La sostituzione chirurgica della valvola aortica, che in passato ha rappresentato un trattamento efficace, è sempre meno adatta alla classe di pazienti emergenti. Infatti, la più comune malattia valvolare consiste ormai nella stenosi aortica degenerativa dovuta a calcificazione senile, che interessa oltre il 10% degli anziani di età superiore ai 75 anni.

A causa dell'età dei pazienti, questa condizione è spesso associata a patologie concomitanti e chirurgia pregressa, fattori che aumentano drasticamente i rischi di mortalità operatoria. Di conseguenza, circa un terzo dei pazienti anziani con stenosi aortica sintomatica viene attualmente escluso dalla pratica chirurgica; e questo numero è in rapido aumento a causa della crescente longevità della popolazione. L'impianto

transcateretere della valvola aortica (TAVI) rappresenta una soluzione ideale per le esigenze di questo gruppo di pazienti, in quanto consente di impiantare una protesi valvolare nel sito anatomico per via percutanea, evitando la chirurgia a cuore aperto e i suoi rischi.

L'esperienza clinica con questo nuovo approccio ne ha chiaramente dimostrato i benefici clinici, evidenziando al contempo la necessità di sostanziali miglioramenti per aumentare la sicurezza e l'efficacia del trattamento. Questo progetto prevede lo sviluppo e la qualificazione preclinica di una nuova valvola aortica protesica adatta per l'impianto TAVI, che supererebbe i principali limiti sperimentati con le soluzioni attualmente disponibili.

IMPATTO

La ricerca svolta nell'ambito di questo progetto ha dimostrato la potenziale efficacia di un nuovo concetto di valvola cardiaca transcateretere, denominata TRISKELE, basata su una struttura autoespandibile a filo di nitinol che supporta tre lembi polimerici e una cuffia di tenuta. La soluzione offre miglioramenti significativi rispetto agli attuali dispositivi TAVI, offrendo una soluzione più semplice ed affidabile a un costo notevolmente inferiore. Inoltre, la possibilità di impiantare il dispositivo in anatomie non calcifiche, confermata dai test su modello animale, indica notevoli potenzialità di espansione dei vantaggi terapeutici dell'impianto transcateretere ai pazienti affetti da insufficienza aortica, per i quali i dispositivi TAVI di prima generazione non sono adatti.

RISULTATI RAGGIUNTI NEL 2019

La ricerca svolta in precedenza ha condotto all'ottimizzazione del disegno e della metodologia costruttiva di un nuovo dispositivo TAVI. Test *in vitro* hanno confermato che le prestazioni idrodinamiche e di stima della vita utile dei dispositivi soddisfano i requisiti richiesti dallo standard internazionale ISO 5840-3:2013. Una versione chirurgica della valvola, con i lembi polimerici, ha adesso completato il periodo di impianto cronico di 90 giorni su modello ovino previsto dalle normative europee. La valvola ha mantenuto la sua funzionalità per l'intera durata degli impianti, e le analisi istologiche sono adesso in fase di perfezionamento.

Questi permetteranno di effettuare test essenziali per confermare la capacità del dispositivo di operare efficacemente *in vivo* per un periodo di 3 mesi.

Nel corso del 2019 Fondazione Ri.MED ha acquisito la proprietà intellettuale relativa al dispositivo (i cui brevetto è già stato concesso sia in Europa che negli Stati Uniti), di cui è adesso unica assegnataria.

OBIETTIVI PER IL 2020

Saranno realizzati prototipi di valvole e cateteri di impianto basati sulla tecnologia sviluppata, ed utilizzati per effettuare un'analisi preclinica cronica *in vivo*, in modelli ovini (50-70 kg), mediante impianto percutaneo. Tale valutazione sarà finalizzata a confermare la facilità di impianto, le prestazioni emodinamiche simili o superiori a dispositivi equivalenti clinicamente accettati, e l'assenza di patologie correlate al dispositivo che ne controindichino l'impiego.

PUBBLICAZIONI

- Gallarelo A., Palombi A., Annio G., Homer-Vanniasinkam S., De Momi E., Maritati G., Torii R., Burriesci G., Wurdemann H.A. (2019) Patient-specific aortic phantom with tunable compliance. ASME J of Medical Diagnostics 2(4):041005.

- Palombi A., Bosi G., Di Giuseppe S., De Momi E., Homer-Vanniasinkam S., Burriesci G., Wurdemann, H. (2019) Sizing the aortic annulus with a robotised, commercially available soft balloon catheter: in vitro study on idealised phantoms. Proceedings of the IEEE International Conference on Robotics and Automation 2019, TuCT1-12.5.

PROPRIETÀ INTELLETTUALE

- Burriesci G., Seifalian, A.M., Zervides, C. (2019) Heart valve prosthesis. Patent US10357358 (B2)

- Burriesci G., Seifalian, A. M., Zervides, C. (2017) Heart Valve Prosthesis. Patent EP2413842 B1



Sequenza di impianto del dispositivo

PRODOTTI: **DISPOSITIVI MEDICI**

Sviluppo di una valvola cardiaca in tessuto animale priva di Alfa-Gal

Gaetano Burriesci, PhD
gburriesci@fondazionerimed.com

COLLABORAZIONI

- University College London (UCL), Londra, Regno Unito
- University of Alabama, Birmingham, Stati Uniti d'America

AREA TERAPEUTICA

Insufficienze d'organo

PIPELINE



BREVE DESCRIZIONE

Le valvole cardiache biologiche tipicamente cedono a causa dell'accumulo di depositi di calcio, che ne danneggiano ed infragiliscono i lembi, causandovi lacerazioni o bloccandone la corretta apertura. Per tali ragioni, già da parecchi anni il mondo accademico e l'industria biomedicale sono impegnati nella ricerca di approcci che permettano di realizzare valvole cardiache biologiche resistenti alla calcificazione. Ciò le renderebbe finalmente adatte ai pazienti più giovani, evitando loro la necessità di assunzione cronica di anticoagulanti. Tuttavia, i trattamenti anti-calcificanti sviluppati sinora non si sono dimostrati efficaci nei giovani adulti. I nostri collaboratori a UCL ed UAB hanno identificato una forma di infiammazione stimolata dal sistema immunitario responsabile

nello stimolare la calcificazione dei tessuti biologici utilizzati nelle valvole cardiache. Questa infiammazione è tipica degli esseri umani, perché una parte del nostro sistema immunitario reagisce ad una sostanza, chiamata Gal, non prodotta nell'uomo, ma sviluppata nei mammiferi da cui viene estratto il tessuto utilizzato nelle valvole biologiche. Per bloccare questa infiammazione immunitaria, sono stati generati maiali geneticamente modificati, inibendo la produzione di Gal. Adesso, stiamo utilizzando il pericardio estratto da questa nuova classe di animali per sviluppare una valvola cardiaca biologica resistente alla calcificazione, che possa essere utilizzata su una popolazione più ampia, migliorando la qualità della vita dei soggetti che la ricevono.

IMPATTO

Ogni anno vengono eseguite nel mondo circa 300 000 sostituzioni di valvole cardiache. Le tipologie di protesi disponibili si distinguono in due categorie principali, le valvole meccaniche, che richiedono una terapia anticoagulante cronica, e le valvole biologiche. Quest'ultime utilizzano lembi biologici normalmente estratti dalle valvole cardiache umane o suine, o realizzate utilizzando pericardio animale. Le valvole cardiache biologiche sono preferibili nei pazienti più anziani (> 65 anni), dove risultano più durevoli.

Al contrario, i soggetti più giovani ricevono solitamente valvole cardiache meccaniche, in quanto le valvole cardiache biologiche vi cederebbero rapidamente per via di meccanismi legati all'età. In particolare, nella totalità dei pazienti di età inferiore ai 35 anni, viene riportato un livello critico di deterioramento strutturale entro 5 anni dall'impianto.

Questo progetto offrirebbe valvole cardiache biologiche durevoli anche ai pazienti più giovani, migliorando la qualità del trattamento ed eliminando la necessità di sottoporli a terapie anticoagulanti permanenti.

Ciò consentirebbe di estendere l'accesso a questa cura più rispettosa della fisiologia umana ad un numero più vasto di individui.

RISULTATI RAGGIUNTI NEL 2019

Sono stati realizzati prototipi di valvole utilizzando pericardio standard e pericardio transgenico (con inibizione dell' α 1,3-galattosiltransferasi) mediante un approccio di fabbricazione sviluppato dal nostro gruppo.

I prototipi sono stati testati *in vitro* per verificarne le prestazio-

ni idrodinamiche e la stima di vita utile. 6 valvole per Gruppo sono state utilizzate in impianti di sostituzione della valvola mitrale su ovino, e lasciate per 90 giorni.

Non si è verificato nessun caso di mortalità attribuibile a malfunzionamenti valvolari, e tutti i dispositivi si sono dimostrati funzionali per l'intera durata dei test. L'analisi istologica degli espianti è in fase di esecuzione

OBIETTIVI PER IL 2020

Si esaminerà in futuro la possibilità di utilizzare tessuti di altre specie animali geneticamente modificate, come il pericardio bovino, che offre un'esperienza clinica ben più estesa rispetto quello suino. Si verificherà inoltre la possibilità di passare alla fase preclinica con i dispositivi precedentemente sviluppati.

CONFERENZE

Rahmani B., McGregor C., Byrne G., Burriesci G. (2019) A Durable Porcine Pericardial Surgical Bioprosthetic Heart Valve: a Proof of Concept. Journal of Cardiovascular Translational Research, 12(4):331-337. <https://doi.org/10.1007/s12265-019-09868-3>.



Prototipo della valvola realizzata in pericardio suino transgenico



Prototipo della valvola dopo 90 giorni di impianto in posizione mitrale su modello ovino

PRODOTTI: BIOMARCATORI - DISPOSITIVI MEDICI

Analisi dell'appendice atriale sinistra per la predizione del rischio di trombosi

Gaetano Burriesci, PhD
gburriesci@fondazionerimed.com

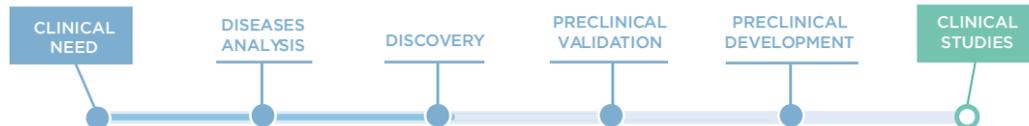
COLLABORAZIONI

- University College London (UCL), Londra, Regno Unito
- Great Ormond Street Hospital (GOSH), Londra, Regno Unito
- Università degli Studi di Palermo, Palermo, Italia

AREA TERAPEUTICA

- Insufficienze d'organo
- Patologie dell'invecchiamento

PIPELINE



BREVE DESCRIZIONE

La fibrillazione atriale (FA) è una patologia caratterizzata da una contrazione irregolare del muscolo cardiaco. A causa degli eventi tromboembolici correlati, la FA può portare a gravi complicazioni come ictus, attacchi ischemici transitori (TIA) e demenza. Il 90% di questi eventi ha origine nell'appendice atriale sinistra, una sacca di tessuto muscolare che protrude dall'atrio sinistro (AS).

Il problema è stato recentemente studiato da numerosi gruppi di ricerca, che si sono focalizzati sul ruolo della morfologia dell'appendice.

Tuttavia, le cause ed i meccanismi responsabili del fenomeno tromboembolico restano ancora poco chiari.

In questo studio, sono stati realizzati modelli dell'atrio sinistro e dell'appendice che replicano i movimenti delle pareti muscolari tipici del processo cardiaco, finora trascurati nelle analisi computazionali di fluido-dinamica, al fine di simulare in maniera più completa i processi cardiocircolatori che si verificano in condizioni normali, e le loro alterati causate dalla FA.

IMPATTO

Lo studio dimostra che il movimento delle pareti dell'atrio e dell'appendice, finora trascurati in letteratura, svolgono un ruolo importante nel promuovere le alterazioni idrodinamiche tipicamente associate al fenomeno tromboembolico. Il modello proposto pone le basi per lo sviluppo di nuovi studi computazionali che potrebbero chiarire le cause dei processi tromboembolici che caratterizzano la FA.

RISULTATI RAGGIUNTI NEL 2019

Sono state create due diverse geometrie per rappresentare la morfologia tipica dei soggetti sani e con FA. I due modelli sono stati ottenuti usando misure da immagini cliniche di risonanza magnetica e tomografia computerizzata, e da precedenti studi morfologici di soggetti sani e con FA. Le due geometrie sono state usate per simulare tre condizioni diverse di fluido-dinamica, che rappresentano: il caso sano di controllo, il caso con FA e un caso intermedio tra i due. Le tre simulazioni sono state impostate imponendo le seguenti condizioni al contorno: velocità della parete dell'atrio, spostamento della parete laterale e mediale dell'appendice, pressione alla valvola mitrale e alle vene polmonari.

Le curve specifiche per ciascuna condizione sono state estratte da elaborazioni matematiche di misurazioni cliniche, da ecocardiografia e tomografia computerizzata. Le analisi CFD ottenute sono state confrontate valutando lo Shear Strain Rate (SSR), una grandezza legata alla risposta reologica e alla trombogenicità del sangue. I risultati indicano che in condizioni di FA, l'SSR ha valori sostanzialmente inferiori rispetto al caso di controllo, producendo condizioni di ristagno di sangue e potenziale trombogenicità.

OBIETTIVI PER IL 2020

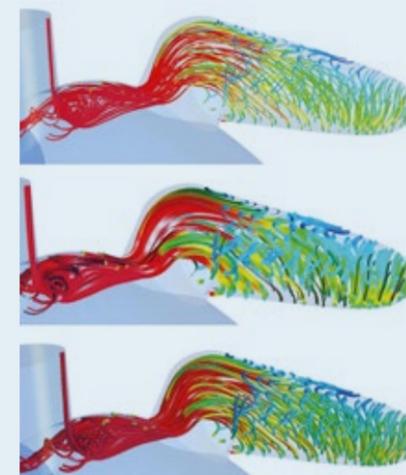
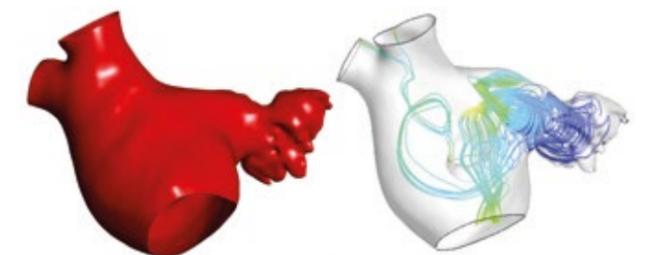
Lo studio descritto si basa su alcune ipotesi chiave che permettono di semplificare il sistema; ad esempio, il sangue è descritto come un fluido newtoniano laminare. In futuro, saranno implementate nuove simulazioni per superare tali approssimazioni. Inoltre, poiché anche il ruolo della morfologia è rilevante, il contributo di questa sarà studiato in concomitanza con il movimento della parete muscolare. A tal fine, la geometria del modello proposto verrà integrata di ulteriori parametri morfologici, che permettano un'analisi *population specific*.

CONFERENZE

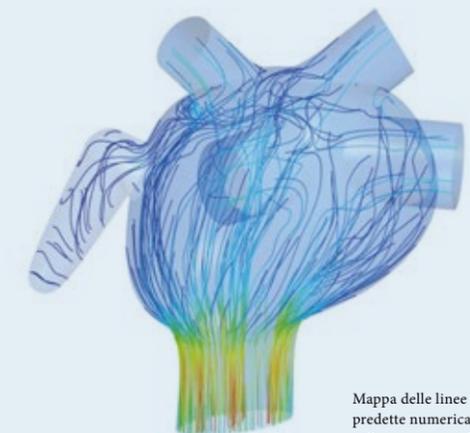
Vella D., Musotto G., Bosi G., Zuccarello B., Burriesci G. (2019) Influenza Della Contrattilità Delle Camera Cardiache Sul Rischio Tromboembolico. 48° Convegno Nazionale AIAS

PUBBLICAZIONI

Annio G., Franzetti G., Bonfanti M., Gallarello A., Palombi A., De Momi E., Homer-Vanniasinkam S., Wurdemann H.A., Tsang V., Diaz-Zuccarini V., Torii R., Balabani S., Burriesci G. (2019) Low cost fabrication of PVA based personalized vascular phantoms for in vitro haemodynamic studies: three applications. ASME Journal of Engineering and Science in Medical Diagnostics and Therapy, n. JESMDT-19-1037, <https://doi.org/10.1115/1.4045760>



Mapa delle linee di flusso stimate numericamente nell'appendice atriale in condizioni operative



Mapa delle linee di flusso predette numericamente nella camera atriale, in condizioni operative sane

PRODOTTI: DISPOSITIVI MEDICI

Analisi idrodinamica della valvola aortica in condizioni ottimali ed alterate

Gaetano Burriesci, PhD
gburriesci@fondazionerimed.com

COLLABORAZIONI

- Università degli Studi di Palermo, Palermo, Italy
- University College London (UCL), Londra, Regno Unito

AREA TERAPEUTICA

- Insufficienze d'organo
- Patologie dell'invecchiamento

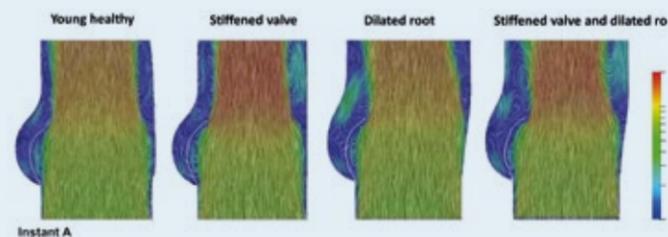
PIPELINE



BREVE DESCRIZIONE

La funzione ottimale delle valvole cardiache, la limitazione dei danneggiamenti ematici e la frequenza degli eventi tromboembolici dipendono tutti dall'emodinamica che si instaura nella regione valvolare. Pertanto, una migliore comprensione dello stato fisiologico sano, ottenibile attraverso lo studio della fluidodinamica che si stabilisce intorno ed attraverso la valvola aortica, è essenziale sia per identificare alterazioni del flusso che possono causare patologie, che per sviluppare dispositivi cardiovascolari migliori e strategie cliniche paziente-specifiche. L'applicazione combinata delle moderne tecniche di ingegneria computazionale, di simulazioni *in vitro* e di *imaging* medicale può contribuire in modo rilevante a pervenire ad una comprensione

adeguata del fenomeno, superando le limitazioni nella risoluzione temporale e spaziale delle singole metodologie.



Mappe della velocità ematica sistolica predette numericamente per pazienti sani giovani, anziani sani ed in situazioni patologiche

IMPATTO

Questo studio si pone come obiettivo lo sviluppo di una piattaforma innovativa, basata sull'integrazione di tecniche numeriche e sperimentali, in grado di analizzare efficacemente l'emodinamica in presenza di valvole aortiche sane e patologiche. Questa piattaforma potrà essere impiegata per prevedere le normali variazioni emodinamiche che si verificano con l'invecchiamento, così come l'effetto di un potenziale trattamento, valutandone sicurezza ed efficacia. Inoltre, le tecnologie implementate possono risultare strumenti importanti per lo sviluppo di soluzioni cliniche e dispositivi medicali di prossima generazione.

RISULTATI RAGGIUNTI NEL 2019

Un modello numerico precedentemente implementato sulla base di uno studio combinato sperimentale-numerico della fluidodinamica nel distretto della radice aortica è stato modificato in modo parametrico, per esaminare le variazioni idrodinamiche che si presentano con il normale avanzare dell'età (irrigidimento dei tessuti ed espansione della radice aortica) e a seguito di diverse terapie sostitutive. Quest'approccio ha condotto ad una comprensione più completa dei meccanismi che determinano ed alterano la funzione della valvola aortica in condizioni di normale invecchiamento, suggerendo parametri valutativi per l'efficacia dei trattamenti.

OBIETTIVI PER IL 2020

Nella fase del progetto seguente sarà essenziale trovare ulteriori conferme dei risultati ottenuti, con metodi sperimentali di velocimetria PIV. La piattaforma così sviluppata sarà ulteriormente affinata per poter servire da riferimento per l'analisi dell'effetto clinico delle alterazioni del flusso indotte da patologie e interventi terapeutici.



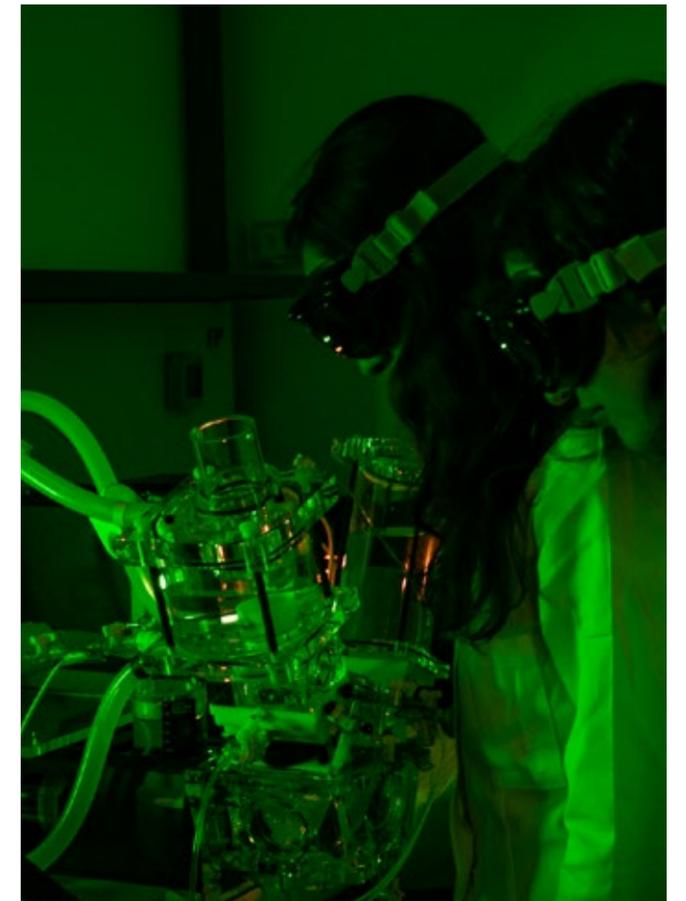
Analisi in vitro con metodologia PIV dei flussi ematici in uscita dalla valvola aortica

CONFERENZE

Salmons Smith J., Tango A. M., Ducci A., Burriesci G. (2019) Healthy Aortic Valve Dynamics - Extension after PIV Validation of a Fluid Structure Interaction. ICIAM 2019 (International Congress on Industrial and Applied Mathematics), Valencia, Spagna.

PUBBLICAZIONI

- Salmons Smith J., Ducci A., Burriesci G. (2019) Does Transcatheter Aortic Valve Alignment Matter Open Heart 6:e001132. doi:10.1136/openhrt-2019-001132
- D'Ascenzo F., Salizzoni S., Saglietto A., Cortese M., Latib A., Franzone A., Barbanti M., Nietlispach F., Holy E.W., Burriesci G., De Paoli A., Fonio P., Atzeni F., Moretti C., D'Amico M., Rinaldi M., Conrotto, F. (2019) Incidence, predictors and cerebrovascular consequences of leaflet thrombosis (LT) after transcatheter aortic valve implantation (TAVI): a systematic review and meta-analysis. European Journal of Cardio-Thoracic Surgery, ezz099.
- Salmons Smith J., Tango A.M., Ducci A., Burriesci, G. (2019) Haemodynamic Issues with Transcatheter Aortic Valve Implantation. In: Giordano A., Biondi-Zoccai G., Frati G. (eds) Transcatheter Aortic Valve Implantation. Springer, Cham, pp 47-59.



Caratterizzazione termomeccanica di biomateriali superelastici Ni-Ti

Gaetano Burriesci, PhD
gburriesci@fondazionerimed.com

COLLABORAZIONI

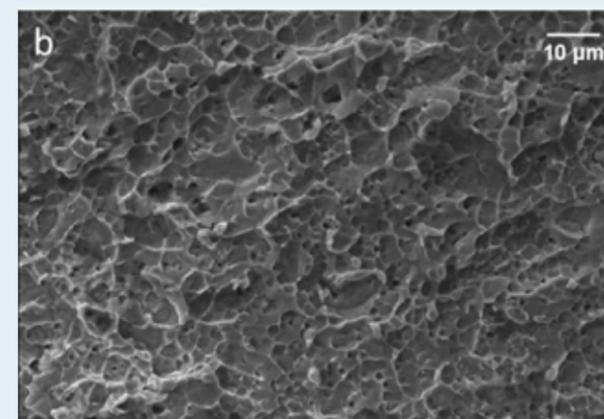
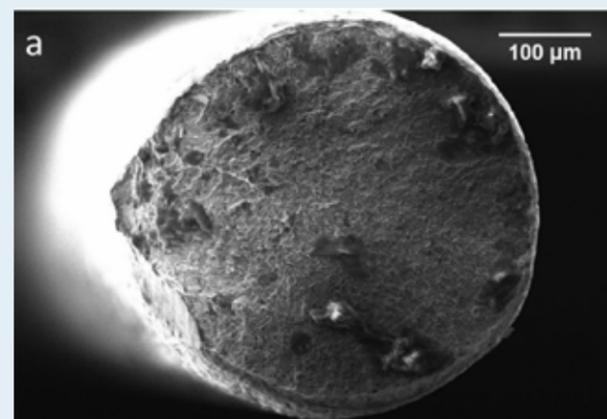
- Università degli Studi di Palermo, Palermo, Italia
- University College London (UCL), Londra, Regno Unito

PIPELINE



BREVE DESCRIZIONE

Il nitinol è una lega biocompatibile che, per via del suo singolare comportamento superelastico, viene comunemente impiegata nella realizzazione di numerosi dispositivi medici impiantabili, quali stent per angioplastica, valvole cardiache transcateretere e impianti dentali. Tuttavia, il meccanismo responsabile di questa singolare risposta meccanica è ancora poco chiaro e, pertanto, non sfruttato appieno. Il comportamento superelastico è causato da una trasformazione di fase reversibile indotta da tensioni meccaniche, che determina una riconfigurazione cristallina dalla struttura austenitica a quella martensitica. Tale processo è associato a rilascio/assorbimento di calore. In questo studio vengono sfruttati questi effetti termici per raggiungere una migliore comprensione del fenomeno e una caratterizzazione più accurata del materiale.



L'immagine mostra la superficie di frattura di un filo di nitinol portato a rottura in prossimità di una giunzione realizzata per microsaldatura laser, osservata al microscopio a scansione elettronica. L'analisi degli avvallamenti, ha permesso di identificare una modalità di cedimento duttile, confermando che il metodo di saldatura adottato preserva le caratteristiche meccaniche e di super-elasticità della lega.

IMPATTO

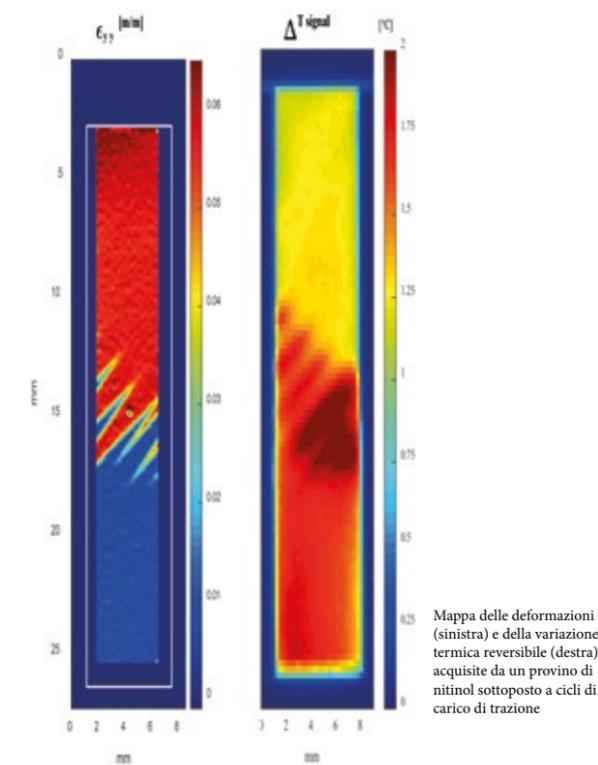
Una migliore comprensione e caratterizzazione del comportamento del nitinol possono contribuire ad accrescere la sicurezza dei dispositivi medici basati su questo materiale. L'implementazione combinata delle tecniche ottiche di correlazione delle immagini digitali e della termografia a infrarossi, sperimentata in questo studio, si è dimostrata un valido supporto nella valutazione del comportamento termo-meccanico di questo materiale complesso, che può contribuire ad estendere la potenziale vita utile di dispositivi medici critici.

RISULTATI RAGGIUNTI NEL 2019

Questo studio ha permesso, per la prima volta, di identificare un approccio per l'impiego dell'analisi dello stress termoelastico al nitinol. Questa tecnica, già adottata con successo per lo studio di materiali convenzionali, consente la determinazione a campo intero delle sollecitazioni in campioni e prototipi, aprendo nuove opportunità per la caratterizzazione strutturale di componenti protesici ad alto rischio.

OBIETTIVI PER IL 2020

In futuro, lo studio si focalizzerà sull'interpretazione delle informazioni derivanti dal segnale di fase dell'effetto termo-elastico, al fine di affinare la metodologia sviluppata. Questa verrà poi applicata per condurre la caratterizzazione termomeccanica di dispositivi medici complessi, ottenendo mappe di tensione a campo intero a partire dal segnale termico e la distribuzione delle deformazioni.



CONFERENZE

Di Leonardo S., Pitarresi, G., Burriesci G. (2019) Evaluation of the transformation domains of super-elastic NiTi shape memory alloy sheets with DIC and Thermoelastic Stress Analysis. 48a Conferenza Nazionale AIAS, Assisi, Italy

Bioreattori per l'elaborazione e deposizione di matrice extra-cellulare (BE-ECM)

Antonio D'Amore, PhD
adamore@fondazionerimed.com

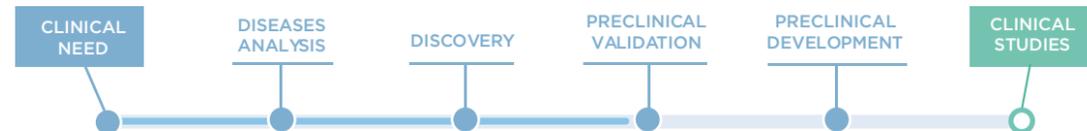
COLLABORAZIONI

- Politecnico di Milano, Milano, Italia
- University of Pittsburgh, Pittsburgh, Stati Uniti
- Universidad de Zaragoza, Zaragoza, Spagna

AREA TERAPEUTICA

- Insufficienze d'organo
- Patologie dell'invecchiamento
- Cancro

PIPELINE



BRIEF DESCRIPTION

Tema: modelli elastomerici in vitro per lo studio della mecano-biologia dei tessuti molli. Tre macro aree sono chiave per il paradigma dell'ingegneria di tessuto e restano al momento relativamente prive di efficaci strumenti di calcolo numerico e di modelli *in vitro*: I) capacità predittiva della meccanica e delle sue correlazione tra la macro scala e la meso-micro scala, II) modelli di crescita tessutale e della sua relazione con i carichi meccanici e le deformazioni, III) modelli di degradazione di materiale *in vivo* e della sua relazione con i carichi meccanici e le deformazioni. Questa linea di ricerca, integrata con le linee NET-IBA e NET-MTG, si prefigge di dare nuove risposte su questi tre differenti

fronti introducendo e perfezionando modelli fisici semplificati di crescita tessutale e degradazione di materiale.

BE-ECM: Integrated empirical and numerical approach to study extracellular matrix synthesis and elaboration in soft tissue. Electrospun polymeric scaffolds microintegrated with cells are generally accepted as *in vitro* model to elucidate the complex mechanism of extracellular matrix (ECM) synthesis *in vivo*. Examples of cardiac tissue surrogates based on biocompatible fibrous scaffolds include cardiac patches, vascular grafts, heart valves and engineered chordae tendineae processed by electrospinning and microintegrated by electrospray. Custom made bioreactors are used to investigate the influence of mechanical load on ECM elaboration. Both mechanical and topological cues are widely recognized as a decisive factors in ECM formation and elaboration. Previous results have shown that de novo collagen production is sensitive to the applied strain level and it is also a function of the mesoscopic niche created by the scaffold micro-architecture. ECM formation and elaboration is evaluated with a multi-scale empirical and numerical approach that includes in-plane mechanical response of the material, micro-architecture characterization via electron microscopy and digital image analysis, histological evaluation and nuclear aspect ratio estimate.

IMPATTO

I principali risvolti di questa ricerca riguardano potenzialmente i progressi nella: capacità di simulare crescita endogena su *scaffold* ingegnerizzati sottoposti a carico meccanico o deformazione alla scala dell'organo; capacità di simulare degradazione *in vivo* di *scaffold* ingegnerizzati; capacità di studiare impatto di segnali topologici e meccanici sull'elaborazione di ECM. Tale potenziale modellistico consente in sintesi di ampliare la conoscenza della mecano-biologia dei biomateriali progettati e consente di verificare, sebbene su sistemi semplificati, efficacia di diverse strategie di ingegneria di tessuto. Esempi di tali strategie includono: regimi di condizionamento per accelerare la crescita tessutale, modulazione dei profili di degradazione, orientare o influenzare la differenziazione cellulare.

RISULTATI RAGGIUNTI NEL 2019

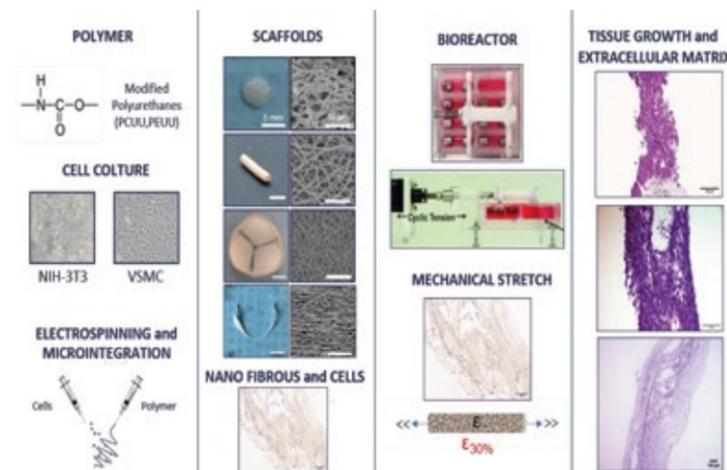
La piattaforma *in silico* sviluppata a partire dal 2009 dal PI ed i suoi collaboratori prevede l'impiego di *scaffold* polimerici di natura fibrosa in grado di sostenere larghe deformazioni combinati con cellule. In particolare, la linea di ricerca progettata a supporto dello sviluppo di valvole cardiache ingegnerizzate (TEHV), vasi sanguigni ingegnerizzati (TEVG) e patch cardiaco (TECP), utilizza bioreattori a carico uniaassiale e poliuretani degradabili (e.g. PEUU, PCUU, PECUU) micro-integrati con cellule via electro-spray. L'obiettivo raggiunto nel 2018 e' stato quello di rispondere a domande fondamentali riguardanti i meccanismi di trasduzione di carico *in vivo* utilizzando sistemi semplificati di sintesi di matrice extracellulare *in silico*. Permutazioni di questo concetto hanno concesso di: individuare un nuovo meccanismo per incrementare la formazione di ECM a parità di carico meccanico di macro scala, principio applicabile a: TECP e TEVG; implementare apparato di condizionamento meccanico di corde tendinee; implementare apparato per indurre degradazione accelerata di valvole cardiache polimeriche.

Awards

- University of Pittsburgh 43rd annual Honors Convocation as outstanding faculty member.

Attività di docenza

- Mentor for the Institute for Clinical Research Education (ICRE). Career development program training the next generation of clinical and translatio-



nal scientists, Univ. of Pittsburgh. Trainee: Casey, Tompkins-Rhoades 2019; - Mentor for BIOENG 1095 - Special projects. Individual research project under the guidance of a faculty member. Department of bioengineering, Univ. of Pittsburgh. Trainees: Daniel Jacobs Li-Ming 2017-2019.

Attività di tutoraggio

- A. Adamo, PhD candidate, University of Palermo Italy, engineering chordae tendineae, mechanical conditioning and mechano-biology;
- D. Jacobs Li-Ming, University of Pittsburgh USA, quantitative methods for ECM mass detection 2016-2019, modelling cell motility on fibrous substrate 2019.

Lezioni su invito

- "Bioinspired polymer processing: how improved control over biomaterial structure-function can facilitate translation", Chemical and petroleum engineering department, graduate seminar, Pittsburgh, July 29, 2019;
- "Bioengineered cardiac tissue: how improved control over biomaterial structure-function can facilitate translation", bioengineering department, graduate seminar, Pittsburgh, April 26, 2019;
- "How to improve control over biomaterials structure-function to design better performing tissue surrogates". Ecole Polytechnique, Paris, France.

OBIETTIVI PER IL 2020

Perfezionare e promuovere la piattaforma sperimentale BE-ECM, in particolare: Individuare regime di condizionamento per corde tendinee artificiali in grado di riprodurre massa e proprietà meccaniche delle corde tendinee native, sottomettere articolo come ultimo autore, progetto di ricerca di dottorato di A. Adamo; Valutare curve di degradazione di nuovi prototipi di valvole atrioventricolari ingegnerizzate sviluppate nella linea di ricerca TEHV; Valutare effetti della topologia dell'intima ingegnerizzata (linea TEVG) sulla proliferazione e stabilità delle cellule endoteliali, proteggere relativa potenziale IP.

CONFERENZE

- H. Mamiya, A. Sahu, A. Cheikhi, S. Shinde, S. Sivakumar, S. Luketich, G. Nasello, B. Van Houten, A. Wise, P. LeDuc, A. D'Amore, A. Barchowsky, F. Ambrosio. Exposure of muscle stem cells to a stiff microenvironment drives an "aged" mitochondrial phenotype. Biomedical engineering society annual meeting, (BMES) October 16- 19 2019, Philadelphia PA, USA.
- H. Mamiya, A. Sahu, A. Cheikhi, S. Shinde, S. Sivakumar, S. Luketich, G. Nasello, B. Van Houten, A. Wise, P. LeDuc, A. D'Amore, A. Barchowsky, F. Ambrosio. Exposure of muscle stem cells to a stiff microenvironment drives an "aged" mitochondrial phenotype. June 9 - 14 2019, Lucca, Italy Myogenesis, Gordon Research Conference.

PUBBLICAZIONI

- A. D'Amore, S. Luketich, R. Hoff, S-H. Ye, and W. Wagner. Blending polymer labile elements at differing scales to affect degradation profiles in heart valve scaffolds. Biomacromolecules, 2019, 20, 7, 2494-2505, IF 5.73.
- D. Pedersen, F. Madonia, C.Tompkins-Rhoades, A. D'Amore, W. R. Wagner. Tissue to Organ Level Evaluation of Heart Valve Scaffold Performance under Dynamic Loading Conditions. American Heart Association (AHA) 2019 Annual meeting November 16-18, Philadelphia PA, USA. Circulation 140 (Suppl. 1), A16249-A16249.

Modelli numerici per la meccanica e la crescita tissutale di tessuti nativi ed ingegnerizzati (NET-MTG)

Antonio D'Amore, PhD
adamore@fondazionerimed.com

COLLABORAZIONI

- University of Pittsburgh, Pittsburgh, Stati Uniti
- UPMC, Pittsburgh, Stati Uniti
- Politecnico di Milano, Milano, Italia

AREA TERAPEUTICA

- Insufficienze d'organo
- Cancro
- Patologie dell'invecchiamento

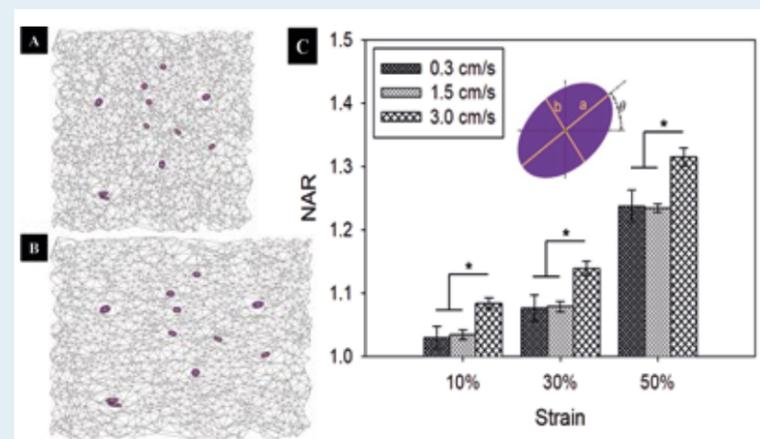
PIPELINE



BREVE DESCRIZIONE

Tema: NET-MTG, sviluppo di modelli numerici strutturali deterministici per predizione della meccanica, crescita di tessuto endogena e degradazione di tessuti ingegnerizzati e nativi.

Tre macro aree, riconosciute come chiave per il paradigma dell'ingegneria di tessuto, restano al momento relativamente prive di efficaci strumenti di calcolo numerico: I) capacità predittiva della meccanica e della correlazione tra la macro scala e la meso-micro scala, II) modelli di crescita tissutale e della sua relazione con i carichi meccanici e le deformazioni, III) modelli di degradazione di materiale *in vivo* e della sua relazione con i carichi meccanici. Questa linea di ricerca cerca di dare nuove risposte su questi tre differenti fronti introducendo e perfezionando modelli strutturali deterministici di tessuti ingegnerizzati e nativi.



NET-MTG: Connecting scaffold large scale and cell meso scale deformations. Fiber network model of polyurethane scaffold seeded with vascular smooth muscle cells showing both un-deformed (A) and strip-biaxial deformation at 30% strain (B). Cell nuclei are shown in purple. Quantification of Nuclear Aspect Ratio (NAR) for three different scaffold types (0.3, 1.5, 3.0 cm/s) fabricated via electrospinning at three different rastering speeds (C). Scaffolds differed only in terms of fiber intersection with the 0.3 cm/s being the most dense material in terms of fiber intersection density. This structural feature while not affecting the macro-scale mechanics affected the cellular deformations inducing a significantly higher deformation (NAR, defined as the ratio between the major and minor axis of the nucleus) for the least dense material.

IMPATTO

Questa ricerca ha potenzialmente impatto su diversi temi di biomeccanica computazionale e la progettazione di biomateriali: creazione di strumenti per assistere la progettazione di tessuti ingegnerizzati e biomateriali; creazione di strumenti per comprendere l'interazione tra meccanica multi-scala, sintesi de-dovo di ECM e degradazione del materiale; creazione di strumenti e metodi per comprendere la relazione tra macro - meso e - micro scala in tessuti nativi i ingegnerizzati, applicazioni: TEHV, TEVG, TECP; creazione di strumenti numerici di indagine per comprendere i processi di invecchiamento di tessuto alla scala della matrice extracellulare; creazione di strumenti numerici di indagine per comprendere i processi di rimodellamento maladattativo e di formazione di tessuto fibroso.



RISULTATI RAGGIUNTI NEL 2019

- Utilizzato algoritmo e metodi predittivi sviluppati negli anni 2010-2014 a supporto della linea BE-ECM. Correlata deformazione nuclei cellulari con meso-architettura dello *scaffold* e suo impatto sulla sintesi de novo di collagene su sistemi *scaffold* in poliuretano - *vascular smooth muscle cells*.
- Capacita' di predizione per: meccanica della macro scala (e.g. risposta biassiale), meccanica della meso-scala (e.g. variazioni di forma del nucleo cellulare, istogramma di deformazione di singola fibra su meso - scala), meccanica della micro-scala (e.g. caratteristica di deformazione a flessione di fibra singola). Attivita' a supporto di due NIH-RO1s attualmente in svolgimento in collaborazione con Dr F. Ambrosio
- Capacita' di riprodurre topologia di materiali a natura fibrosa.
- Sviluppati modelli numerici di predizione campo elettrico nei processi di elettrofilatura a componente doppia (DCD).

Fondi di ricerca ottenuti e/o gestiti

- NIH RO1, Aging of the myomatrix and its effect on skeletal muscle regeneration, \$ 2 million for 2019-2023. PI: F. Ambrosio, University of Pittsburgh. Co-Investigator: A. D'Amore (15% efforts), University of Pittsburgh;
- NIH RO1, Dysfunctional muscle remodeling and regeneration in environmental disease, \$ 2.6 million for 2016-2021. PIs: F. Ambrosio, A. Barchowski, University of Pittsburgh. Co-Investigators: A. D'Amore (10% efforts), W. Wagner, D. Stolz, University of Pittsburgh.

Premi conseguiti

- University of Pittsburgh 43rd annual Honors Convocation as outstanding faculty member.

Attivita' di docenza

- Mentor for the Institute for Clinical Research Education (ICRE). Career development program training the next generation of clinical and translational scientists, Univ. of Pittsburgh. Trainee: Casey, Tompkins-Rhoades 2019;
- Mentor for BIOENG 1095 - Special projects. Individual research project under the guidance of a faculty member. Department of bioengineering, Univ. of Pittsburgh. Trainees: Daniel Jacobs Li-Ming 2017-2019.

Attivita' di tutoraggio

- P. Terranova, University of Palermo Italy, predictive models for electric voltage distribution in double component deposition;
- M. Traina, University of Palermo Italy, novel fiber deposition technique for biodegradable suture material;
- C. T. Rhoades, School of Medicine, University of Pittsburgh USA, engineered mitral valve optimization via FEM;

- D. Jacobs Li-Ming, University of Pittsburgh USA, quantitative methods for ECM mass detection 2016-2019, modelling cell motility on fibrous substrate 2019.

Lezioni su invito

- "Bioinspired polymer processing: how improved control over biomaterial structure-function can facilitate translation", Chemical and petroleum engineering department, graduate seminar, Pittsburgh, July 29, 2019;
- "Bioengineered cardiac tissue: how improved control over biomaterial structure-function can facilitate translation", bioengineering department, graduate seminar, Pittsburgh, April 26, 2019;
- "How to improve control over biomaterials structure-function to design better performing tissue surrogates". Ecole Polytechnique, Paris, France.



OBIETTIVI PER IL 2020

Gli obiettivi per i 2019-2021 sono in linea con il ruolo ancellare che questa linea di ricerca svolge nell'ambito del programma di ingegneria di tessuto cardiovascolare della Fondazione Ri.MED e delle azioni congiunte con i suoi partner di ricerca clinica, in particolare:

- supporto alla progettazione per linee di ricerca TEHV, TECP e TEVG;
- supporto alla modellazione *in vitro* prevista in BE-ECM;
- sviluppo (2018-2020) modelli predittivi di crescita tissutale sulla base degli studi *in vivo* completati:
 - D'Amore, T. Yoshizumi, S. K. Luketich, M. T. Wolf, X. Gu, M. Cammarata, R. Hoff, S.F. Badyak, and W. R. Wagner. Bi-layered polyurethane-extracellular matrix cardiac patch improves ischemic ventricular wall remodeling in a rat model. *Biomaterials* 2016 (107), 1-14, 5Y-IF 8.97;
 - D'Amore, M. Fazzari, H. Jiang, S. K. Luketich, M. E. Luketich, R. F. Hoff, D. L. Jacobs, X. Gu, S. F. Badyak, B. A. Freeman, W.R. Wagner. Nitro-oleic acid (NO₂-OA) release enhances regional angiogenesis in a rat abdominal wall defect model. Accepted on *Tissue Engineering Part A*, IF 3.58;
- sviluppo (2018-2020) modelli di simulazione degradazione di *scaffold in vivo*;
- sviluppo (2018-2020) modelli di simulazione di migrazione cellulare al variare della topologia del biomateriale.



CONFERENZE

- H. Mamiya, A. Sahu, A. Cheikhi, S. Shinde, S. Sivakumar, S. Luketich, G. Nasello, B. Van Houten, A. Wise, P. LeDuc, A. D'Amore, A. Barchowski, F. Ambrosio. Exposure of muscle stem cells to a stiff microenvironment drives an "aged" mitochondrial phenotype. Biomedical engineering society annual meeting, (BMES) October 16- 19 2019, Philadelphia PA, USA.
- H. Mamiya, A. Sahu, A. Cheikhi, S. Shinde, S. Sivakumar, S. Luketich, G. Nasello, B. Van Houten, A. Wise, P. LeDuc, A. D'Amore, A. Barchowski, F. Ambrosio. Exposure of muscle stem cells to a stiff microenvironment drives an "aged" mitochondrial phenotype. June 9 - 14 2019, Lucca, Italy Myogenesis, Gordon Research Conference.



PUBBLICAZIONI

- A. D'Amore, S. Luketich, R. Hoff, S-H. Ye, and W. Wagner. Blending polymer labile elements at differing scales to affect degradation profiles in heart valve scaffolds. *Biomacromolecules*, 2019, 20, 7, 2494-2505, IF 5.73.
- D. Pedersen, F. Madonia, C. Tompkins-Rhoades, A. D'Amore, W. R. Wagner. Tissue to Organ Level Evaluation of Heart Valve Scaffold Performance under Dynamic Loading Conditions. American Heart Association (AHA) 2019 Annual meeting Nov. 16-18, Philadelphia PA, USA. *Circulation* 140 (Suppl. 1), A16249-A16249.

PRODOTTI: DISPOSITIVI MEDICI & INGEGNERIZZAZIONE DI TESSUTI ED ORGANI

Analisi strutturale ed istopatologica per immagini di tessuti nativi ed ingegnerizzati (NET-IBA)

Antonio D'Amore, PhD
adamore@fondazionerimed.com

COLLABORAZIONI

- University of Pittsburgh, Pittsburgh, Stati Uniti
- Università degli Studi di Palermo, Italia
- University of Nagoya, Giappone

AREA TERAPEUTICA

- Insufficienze d'organo
- Patologie dell'invecchiamento
- Cancro

PIPELINE



BREVE DESCRIZIONE

Tema: NET-IBA, sviluppo di algoritmi e metodi automatici per l'analisi strutturale e morfologica di tessuti nativi e scaffolds. L'istopatologia ed i metodi di analisi quantitativa di struttura su base immagine sono al momento scarsamente sviluppati in modo integrato. Gran parte delle valutazioni in istologia avvengono ancora sulla base di stime qualitative o semi-qualitative. Analogamente, i metodi di analisi di immagine digitale sviluppati in contesti di scienza dei materiali non vengono ideati con un focus di potenziale rilevanza clinica. Questa linea di ricerca si posiziona all'interfaccia tra queste

due discipline nel tentativo di fornire nuovi strumenti di indagine sia in ambito clinico che in ambito scienza dei materiali.

Fig. 1 - NET-IBA: Algorithm for quantitative angiogenesis evaluation. Accurate identification and quantification of blood vessels can be labour intensive, time consuming and heavily dependent on the operator experience. An automated, objective method has been developed and validated, the block diagram illustrates the structure of the algorithm. (from left to right): a) input image, b) filtering and thresholding on red or green color channels, c1) detection of connected components, c2) morphological segmentation based on size and shape, c3) additional detection of connected components, d) segmentation criteria in c1,c2,c3 are combined together using morphological operators, e) labeling of connected components, f) algorithm' result including vessel area quantification and spatial distribution (right)

IMPATTO

Il software sviluppato in questa linea di ricerca ha impatto potenziale su due direttrici principali:

- Metodi innovativi di istologia quantitativa, con applicazioni potenziali che includono: interazione biomateriale-organismo, valutazione effetto farmaci, valutazione risposta infiammatoria, oncologia, crescita di tessuto *in vitro* ed *in vivo*, *big-data*.
- Metodi innovativi di analisi morfologica di materiali micro e nano-strutturati, applicazioni potenziali in contesto di ingegneria della produzione, ingegneria chimica e dei materiali includono: controllo di processo, caratterizzazione di processo, caratterizzazione struttura funzione.

RISULTATI RAGGIUNTI NEL 2019

- *Leadership* nei metodi di analisi topologica di ECM di tessuti nativi e scaffold;
- Consolidata *expertise e leadership* nell'analisi strutturale di tessuti nativi e scaffold sulla base di immagini ed elaborazione digitale. Software disponibili includono: analisi micro-architettura di tessuti fibrosi, analisi di porosità, analisi di collagene ed elastina su tessuti nativi, analisi topologica di infiltrazione cellulare, marker specifici e polarizzazione macrofagi;
- Mantenuta collaborazione industriale con *start-up* company PECA Lab. Tema: caratterizzazione strutturale di medical device classe III FDA;
- Avviato nuovo progetto in collaborazione con il Dr. Takamari, Dep. Plastic Surgery, University of Nagoya, tema: evoluzione della morfologia del collagene a seguito di interventi di chirurgia plastica, dati elaborati da campione umano;
- Completato software per l'individuazione automatica di vasi sanguigni su sezioni istologiche; Collaborazione attiva con il Dr. Bruno, e Dr. Ardizzone affiliati con CNR ed Univ. Palermo.

OBIETTIVI PER IL 2020

- Estensione 3D dei metodi di analisi 2D sviluppati per materiali micro e nano strutturati. La corrente versione del software di analisi

sviluppato "Gordium" prevede l'impiego di dati 2D da microscopia elettronica, la ricerca pianificata per il 2018-2021 prevede l'estensione di questo metodo su 3D e sulla base di dati da microscopia confocale;

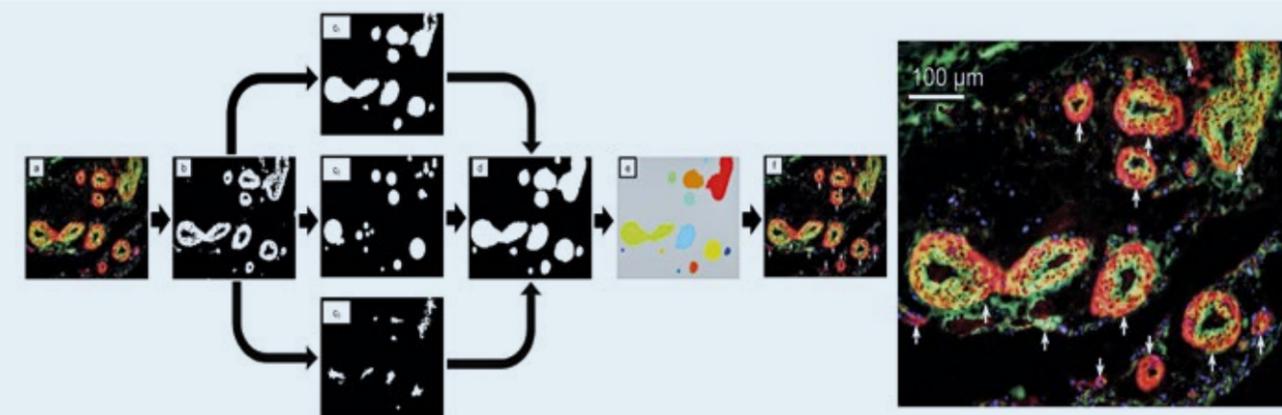
- Completare validazione tecniche di analisi di angiogenesi. L'attuale versione del software sviluppato in collaborazione con il Dr. Bruno prevede routine in grado di elaborare dati da microscopia per fluorescenza, lo stesso approccio verrà applicato a dati istologici (e.g. H&E o Masson' staining). Una seconda linea di sviluppo riguarda l'implementazione di un codice automatico per la segmentazione morfologica dei vasi sanguigni individuati che verranno classificati per categorie secondo quanto dimostrato sperimentalmente in: "A. D'Amore, M. Fazzari, H. Jiang, S. K. Luketich, M. E. Luketich, R. F. Hoff, D. L. Jacobs, X. Gu, S. F. Badylak, B. A. Freeman, W.R. Wagner. Nitro-oleic acid (NO₂-OA) release enhances regional angiogenesis in a rat abdominal wall defect model. Published on Tissue Engineering Part A."

CONFERENZE

- H. Mamiya, A. Sahu, A. Cheikhi, S. Shinde, S. Sivakumar, S. Luketich, G. Nasello, B. Van Houten, A. Wise, P. LeDuc, A. D'Amore, A. Barchowsky, F. Ambrosio. Exposure of muscle stem cells to a stiff microenvironment drives an "aged" mitochondrial phenotype. Biomedical engineering society annual meeting, (BMES) October 16- 19 2019, Philadelphia PA, USA.
- H. Mamiya, A. Sahu, A. Cheikhi, S. Shinde, S. Sivakumar, S. Luketich, G. Nasello, B. Van Houten, A. Wise, P. LeDuc, A. D'Amore, A. Barchowsky, F. Ambrosio. Exposure of muscle stem cells to a stiff microenvironment drives an "aged" mitochondrial phenotype. June 9 - 14 2019, Lucca, Italy Myogenesis, Gordon Research Conference.

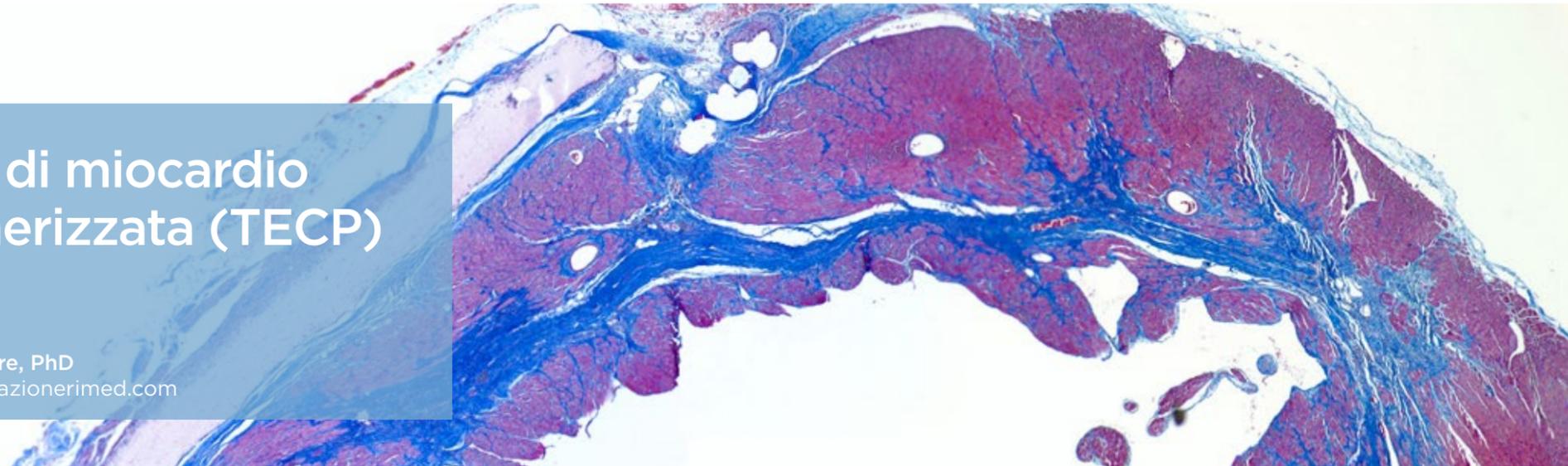
PUBBLICAZIONI

- A. D'Amore, S. Luketich, R. Hoff, S-H. Ye, and W. Wagner. Blending polymer labile elements at differing scales to affect degradation profiles in heart valve scaffolds. *Biomacromolecules*, 2019, 20, 7, 2494-2505, IF 5.73.
- D. Pedersen, F. Madonia, C. Tompkins-Rhoades, A. D'Amore, W. R. Wagner. Tissue to Organ Level Evaluation of Heart Valve Scaffold Performance under Dynamic Loading Conditions. American Heart Association (AHA) 2019 Annual meeting November 16-18, Philadelphia PA, USA. *Circulation* 140 (Suppl. 1), A16249-A16249.



Parete di miocardio ingegnerizzata (TECP)

Antonio D'Amore, PhD
adamore@fondazionerimed.com



COLLABORAZIONI

- University of Pittsburgh, Pittsburgh, Stati Uniti
- UPMC, Pittsburgh, Stati Uniti
- University of Cincinnati, Cincinnati, Stati Uniti
- IRCCS ISMETT, Palermo, Italia
- Mario Negri, Milano, Italia
- Universidade Estadual de Campinas, Campinas, Brasile
- University of Texas, Austin, Stati Uniti
- Virginia Commonwealth University, Richmond, Stati Uniti
- ATeN Center, Università di Palermo, Italia



AREA TERAPEUTICA

Insufficienze d'organo



IMPATTO

L'obiettivo di questa linea di ricerca e' l'introduzione di strategie e tecnologie innovative per mitigare il rimodellamento maladattativo indotto dall'infarto del miocardio. Congestive heart failure (CHF) rimane una condizione di notevole impatto epidemiologico (2.1 % della popolazione in US) ancora parzialmente trattata con successo da terapie farmacologiche, chirurgiche o dai VAD. I dispositivi di confinamento cardiaco biodegradabili si propongono come una potenziale terapia ponte in attesa del trapianto d'organo o come una strategia sinergica rispetto l'impiego di un VAD. Ulteriore potenziale campo di applicazione riguarda il patching del ventricolo destro finalizzato alla riduzione degli effetti legati alla ipertensione polmonare.



RISULTATI RAGGIUNTI NEL 2019

Completato studio *in vivo* su ratto, valutati effetti della sequenza temporale d'intervento per il patch cardiaco a doppio strato, risultati principali: riduzione assottigliamento parete, angiogenesi, riduzione tessuto fibrotico, mantenimento funzione ventricolare a 10 settimane dall'infarto, switch macrofagi M1-M2. Concluso con successo trapianto autologo di flap muscolare ottenuto da patch multi strato, progetto finanziato da AFIRM- DoD, modello animale: ratto e coniglio.

Fondi di ricerca ottenuti e/o gestiti

MIUR DOT1720429, "Dottorati di ricerca innovativi a caratterizzazione industriale", PhD student salary support of - €21k/year for 01/2018 - 12/2020. Co-PI: A. D'Amore, University of Pittsburgh, Co-PI: G. Gherzi, Università di Palermo.

Premi conseguiti

University of Pittsburgh 43rd annual Honors Convocation as outstanding faculty member.

Attività di docenza

- Guest lecturer for the biomedical engineering master of science and PhD program, BIOENG 2810 - Biomaterials & biocompatibility. Department of bioengineering, University of Pittsburgh. Title: "A brief overview on polymers processing methods for soft tissue engineering";
- Guest lecturer for the biomedical engineering master of science and PhD program, MSCMP 3735 - Extracellular matrix in tissue biology and bioengineering. Department of bioengineering, University of Pittsburgh. Title: "Cardiac ECM: structure - function, damage mechanism, and tissue engineering approaches to facilitate constructive remodelling".

Attività di tutoraggio

- A. Adamo, PhD candidate, University of Palermo Italy, cardiac patch development;

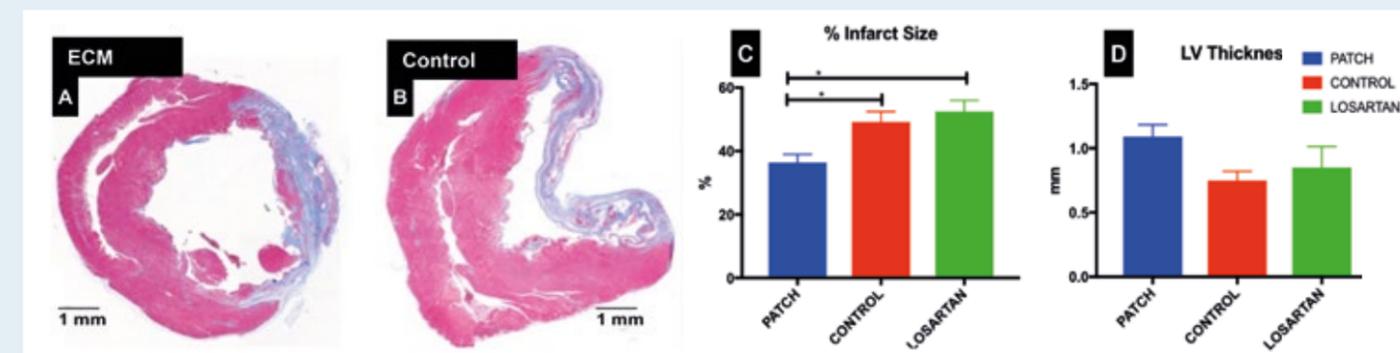
PIPELINE



BREVE DESCRIZIONE

Tema: TECP, sviluppo di dispositivi di confinamento e supporto della funzione cardiaca per pazienti affetti da infarto del miocardio. I dispositivi di confinamento cardiaco si propongono come una terapia alternativa a quelle farmacologiche, chirurgiche o all'impiego di dispositivi di supporto ventricolare (VAD). Il principio di base dei dispositivi di confinamento cardiaco e' quello di fornire supporto meccanico al ventricolo mediante l'impianto chirurgico di pareti ingegnerizzate che vengono impiantate nell'epicardio infartuato. Tali pareti possono essere realizzate in modo da avvolgere l'intero ventricolo, oppure in modo da essere posizionate esclusivamente nell'area infartuata (cerotto cardiaco).

I materiali impiegati possono essere progettati al fine di degradarsi gradualmente oppure in modo da rimanere come strutture permanenti non rigide. Lo *scaffold* (cerotto cardiaco) utilizzato in questa linea di ricerca e' progettato per promuovere la crescita endogena di tessuto e, idealmente, indurre la rigenerazione o la protezione del tessuto cardiaco sano in prossimità della zona infartuata. A tal fine, il nostro approccio prevede due nozioni di base: progettare cerotti cardiaci basati su matrici polimeriche in grado di riprodurre la meccanica nativa, utilizzare *scaffold* compositi multi-strato dove lo strato dello *scaffold* a contatto con l'epicardio e' costituito da matrice extracellulare bioattiva.



TECP: Long term effects of extracellular matrix-polymeric patch on infarct size and left ventricle thickness. (A-B) Typical MT stained whole heart sections and infarct/patch regions at the 16 wk time point. The ECM scaffold explants showed higher host cell infiltration and reduced fibrosis. (C-D) Quantitative comparison of infarct size and ventricle thickness in histological sections between patch treated, infarction control and Losartan treated groups. n=6, mean ± sem, *p<0.05.



PRODOTTI: **DISPOSITIVI MEDICI & INGEGNERIZZAZIONE DI TESSUTI ED ORGANI**

- P. I. Gonzalez, University of Pittsburgh USA, biomimetic three-layers vascular graft;
- A. Fazal, University of Pittsburgh USA, engineered chordae tendineae;
- D. Jacobs Li-Ming, University of Pittsburgh USA, quantitative methods for ECM mass detection.

Lezioni su invito

- "Bioinspired polymer processing: how improved control over biomaterial structure-function can facilitate translation", Chemical and petroleum engineering department, graduate seminar, Pittsburgh, July 29, 2019;
- "Bioengineered cardiac tissue: how improved control over biomaterial structure-function can facilitate translation", bioengineering department, graduate seminar, Pittsburgh, April 26, 2019;
- "How to improve control over biomaterials structure-function to design better performing tissue surrogates". Ecole Polytechnique, Paris, France.

 **OBIETTIVI PER IL 2020**

L'obiettivo di lungo termine rimane la traslazione della tecnologia che viene inquadrata come un dispositivo di classe III FDA, gli obiettivi specifici per l'anno 2020 sono:

- Valutazione di *scaffold per patch* cardiaco su modello animale di larga taglia, obiettivi primari: (I) mantenimento delle funzioni ventricolari; (II) crescita tessutale endogena/riduzione di tessuto fibrotico; (III) riduzione dell'assottigliamento della parete di miocardio;
- Impiego di rilascio controllato di nitro-fatty acid per la rigenerazione del miocardio, in collaborazione con Dr. Fazzari.
- Esplorare tecniche di impianto minimamente invasivo del patch cardiaco, progetto in collaborazione con il Dr Pilato, Dr Morsolini, Dr Raffa (ISMETT);
- Effetti, metodi e potenziali del patching di ventricolo destro, progetto in collaborazione con il Dr Coyan, Dr Silveira-Filho e Dr Sciortino.

 **CONFERENZE**

L. M. Silveira-Filho, G. Coyan, **A. D'Amore**, S. K. Luketich, G. Menallo, A. Adamo, Y. Matsumura, N. Kashiyama, W. R. Wagner. Bio-Hybrid Cardiac Patch Combining Poly(ester carbonate urethane)urea and Porcine Cardiac Extracellular Matrix Digest Induces Improved Ventricular Remodeling in a Model of Chronic Ischemia. Proceedings of the Society for Biomaterials Annual Meeting (SfB 2019), 3rd -6h April 2019 Seattle, Washington.

 **PUBBLICAZIONI**

- Y. Matsumura, Y. Zhu, H. Jiang, **A. D'Amore**, S. K. Luketich, V. Charwat, T. Yoshizumi, H. Sato, B. Yang, T. Uchibori, K. E. Healy, W. R. Wagner. Intramyocardial injection of a fully synthetic hydrogel attenuates left ventricular remodeling post myocardial infarction. Biomaterials 2019, 217, 119289, IF 10.23.

- M. Murdock, J. Chang, S. Luketich, D. Pedersen, G. Hussey, **A. D'Amore**, S. Badylak. Cytocompatibility and mechanical properties of surgical sealants for cardiovascular applications. Journal of Thoracic and Cardiovascular Surgery, 2019, S0022-5223(18)32289-X. IF 4.88.

 **PROPRIETÀ INTELLETTUALE**

- US provisional patent application 62/874114, filed on 07/2018, additional data filed in 10/2019, topic: biomedical device, title: "Processing method and apparatus for micro-structured rope-like material.". Lead innovator/developer: **A. D'Amore**.

- US patent application PCT/US2018/061862 with WO (International publication number WO/2019/100021) published in 05/2019, topic: controlled release system/drug for angiogenesis, title: "Nitro-oleic acid (NO₂-OA) controlled release platform to induce regional angiogenesis in abdominal wall repair". Lead innovator/developer: **A. D'Amore**.

Valvole cardiache ingegnerizzate (TEHV)

Antonio D'Amore, PhD
adamore@fondazionerimed.com

 **COLLABORAZIONI**

- University of Pittsburgh, Pittsburgh, Stati Uniti
- UPMC, Pittsburgh, Stati Uniti
- University of Cincinnati, Cincinnati, Stati Uniti
- IRCCS ISMETT, Palermo, Italia
- West Virginia University, Morgantown, Stati Uniti
- Harvard Medical School, Boston, Stati Uniti
- Universidade Estadual de Campinas, Campinas, Brasil
- University of Texas at Austin, Austin, Stati Uniti

 **AREA TERAPEUTICA**
Insufficienze d'organo

PIPELINE



 **BREVE DESCRIZIONE**

Tema: TEHV, sviluppare tessuti artificiali e protesi valvolari per la sostituzione e riparazione di valvole cardiache.

Obiettivi specifici:

- Caratterizzare e riprodurre struttura e meccanica delle valvole cardiache umane;
- Progettazione, prototipazione e validazione di protesi valvolari innovative in grado di:
 - Indurre crescita tessutale endogena;
 - Incrementare la resistenza alla calcificazione;
 - Ridurre la trombogenicità.

- Sviluppo di tecnologie e strategie di intervento percutaneo transcatetere.

L'approccio utilizzato si basa su un metodo di lavorazione innovativo per polimeri chiamato deposizione a doppia componente (DCD), sviluppato dal gruppo del Dr D'Amore. DCD consente la fabbricazione di protesi valvolari di natura fibrosa che inducono la crescita tessutale in-situ. Il processo di lavorazione consente inoltre il controllo della micro-macro struttura e delle proprietà meccaniche.

IMPATTO

Circa 80000 pazienti all'anno richiedono una sostituzione valvolare in US. La pratica clinica oggi prevede l'impiego di due classi di protesi: le valvole meccaniche e le bioprotesi. Le prime, per quanto longeve, richiedono l'uso di terapia anticoagulante cronica che a sua volta e' associata con diversi fattori di rischio in aggiunta ad una riduzione della qualita' della vita del paziente. La seconda categoria non richiede terapia anticoagulante cronica ma e' soggetta ad una serie di fenomeni deteriorativi tra i quali la degenerazione calcifica. Le tecnologie sviluppate dal gruppo hanno l'obiettivo di superare i limiti di queste due classi di dispositivi biomedicali offrendo ai pazienti delle valvole cardiache che crescono con il paziente, non richiedono terapia anticoagulante e non sono esposte alla degenerazione calcifica. Tale ricerca e' inoltre funzionale allo sviluppo di tecnologie innovative di lavorazione dei polimeri applicabili in altri contesti, nonché alla creazione di dispositivi biomedicali ibridi basati su metallo biodegradabile-polimero biodegradabile.

RISULTATI RAGGIUNTI NEL 2019

Completata valutazione acuta su cavia di larga taglia per valvole polmonari e tricuspid, proseguita valutazione del prototipo di valvola mitrale su medesimo modello. Consolidata ed estesa IP per la biofabbricazione di corde tendinee. Esteso il piano di caratterizzazione di tessuti cardiaci nativi includendo: valvole cardiache, miocardio, coronarie, corde tendinee. Proseguita caratterizzazione di campioni umani da donatore mediante collaborazione con fondazione Core, USA. Iniziato studio della meccanobiologia delle corde tendinee. Consolidato OneValve IP portfolio.

Fondi di ricerca ottenuti e/o gestiti

- Pitt Innovation Challenge (PinCh) program. OneValve: The Self Generating Heart Valve, the team (Drs Cohan, D'Amore, Wagner) was ranked #1st and was awarded for \$ 100,000. PI: A. D'Amore, Univ. of Pittsburgh;
- Pitt Ventures First Gear Program (NSF grant number IIP1734751). OneValve: The Self Generating Heart Valve, \$ 3000. PI: A. D'Amore, University of Pittsburgh;
- Randall family big idea competition, University of Pittsburgh. Team: A. Adamo, G. Cohan, D Pedersen. Second place presentation winner - \$15000, principal investigator: A. D'Amore.

Premi conseguiti

- University of Pittsburgh 43rd annual Honors Convocation as outstanding faculty member;
- Acute *In Vivo* Functional Assessment of a Biodegradable Stentless Elastomeric Tricuspid Valve. G. Cohan, L. Silveira Filho, Y. Matsumura, S. Luketich, W. Katz, V. Badhwar, W. Wagner, A. D'Amore. First place presentation winner of the 27th American Heart Association's Fellows research day, Pittsburgh 01-2019, senior investigator: A. D'Amore;
- Top 2 proposte progettuali presso Pitt e UPMC per la Betty Moore Foundation Innovators award 2020.

Attività di docenza

- Mentor for the Institute for Clinical Research Education (ICRE). Career development program training the next generation of clinical and translational scientists, Univ. of Pittsburgh. Trainee: Casey, Tompkins-Rhoades 2019;
- Mentor for BIOENG 1095 - Special projects. Individual research project under the guidance of a faculty member. Department of bioengineering, Univ. of Pittsburgh. Trainee: Mahdi Haghkar 2019;
- Mentor for ENGR1000 - Lab experiences. Individual research project under the guidance of a faculty member. Department of chemical and petroleum engineering, Univ. of Pittsburgh. Trainee: Mahdi Haghkar 2019.

Attività di tutoraggio

- A. Adamo, PhD candidate, University of Palermo Italy, engineering chordae tendineae, bioprocessing and cell seeding;
- P. Terranova, University of Palermo Italy, topological cues for enhanced endothelial cell proliferation, bioprocessing;
- F. Madonia, University of Palermo Italy, functional assessment of engineered mitral valve and chordal apparatus via pulse duplicator test;
- M. Traina, University of Palermo Italy, novel fiber deposition technique for biodegradable suture material;
- G. Miceli, University of Palermo Italy, micro-groove patterns for enhanced engineered valve anisotropy and fiber geometry control;
- C. T. Rhoades, School of Medicine, University of Pittsburgh USA, engineered mitral valve optimization via FEM.

Lezioni su invito

- "How scaffold processing variables affect engineered heart valve morphology and mechanics", The Heart Institute annual meeting, Children Hospital, University of Pittsburgh Pittsburgh, September 18-2019;
- "Bioengineered cardiac tissue: how improved control over biomaterial structure-function can facilitate translation", bioengineering department, graduate seminar, Pittsburgh, April 26, 2019;
- "How scaffold processing variables affect engineered heart valve morphology and mechanics", session: valve tissue engineering: do we understand variability in outcomes? The Heart Valve Society annual meeting, Sitges, Barcelona, Spain, April 11-13, 2019.

OBIETTIVI PER IL 2020

L'obiettivo di lungo termine e' la traslazione della tecnologia (class III FDA), obiettivi specifici per il 2020 sono definiti come segue:

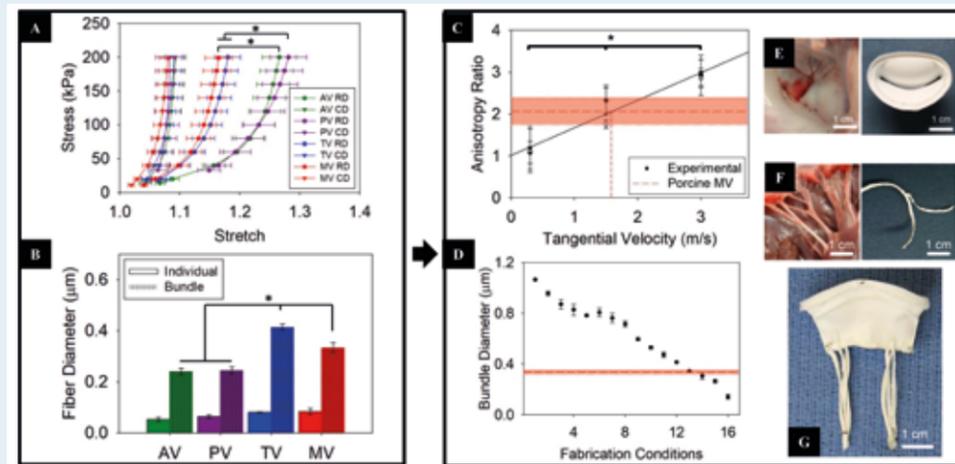
- Esecuzione studio finanziato via PinCH su polmonare stented DCD + magnesio degradabile;
- Completamento studio acuto su protesi mitrale DCD;
- Formulazione di proposta progettuale per finanziare studio cronico su protesi mitrale DCD: NIH R01 e ERC consolidator, Betty Moore Foundation Innovators award;
- Pubblicare risultati sullo studio completato riguardante bioprocessing e meccanobiologia corde tendinee;
- Completamento modellazione FEM apparato cordale;
- Valutazione nuove strategie di deposizione selettiva di fibre per DCD;
- Protezione e consolidamento IP;
- Perfezionamento business plan e modellazione finanziaria OneValve;
- Promozione della tecnologia presso VC;
- Formazione personale: sette studenti di laurea master, due dottoranti;
- Consolidamento programma di internship McGowan Institute-UNIPA.

CONFERENZE

- Valve. G. Cohan, L. Silveira Filho, Y. Matsumura, S. Luketich, W. Katz, V. Badhwar, W. Wagner, A. D'Amore. Acute *In Vivo* Functional Assessment of a Biodegradable Stentless Elastomeric Tricuspid American Association for Thoracic Surgery (AATS 2019) 2019 meeting: May 4-7, 2019 Toronto, Canada.
- C. Tompkins-Rhoades, S. Pasta, G. Cohan, L.M. Silveira Fihlo, A. D'Amore. Optimizing the development of a tissue engineered mitral valve using a computational model. The Society of Black Academic Surgeons (SBAS 2019) annual meeting. April 25th - 27th New York, USA.
- A. Adamo, G. Spiaggia, W. Wagner, A. D'Amore. A new mandrel-less electrospinning method for generating Biomimetic Engineered Chordae Tendineae. 8th International Conference on Mechanics of biomaterials and tissues 2019 - Waikoloa Beach, Hawaii, USA.

PUBBLICAZIONI

- A. D'Amore, S. Luketich, R. Hoff, S-H. Ye, and W. Wagner. Blending polymer labile elements at differing scales to affect degradation profiles in heart valve scaffolds. *Biomacromolecules*, 2019, 20, 7, 2494-2505, IF 5.73.
- G. N. Cohan, A. D'Amore, Y. Matsumura, D. D. Pedersen, S. K. Luketich, V. Shanov, T. E. David, W. R. Wagner, V. Badhwar. *In vivo* functional assessment of a novel degradable metal and elastomeric scaffold-based tissue engineered heart valve. *J. of Thoracic and Cardiovascular Surgery*, 2019; 157: 1809-1816, IF 4.88.
- D. Pedersen, F. Madonia, C.Tompkins-Rhoades, A. D'Amore, W. R. Wagner. Tissue to Organ Level Evaluation of Heart Valve Scaffold Performance under Dynamic Loading Conditions. American Heart Association (AHA) 2019 Annual meeting November 16-18, Philadelphia PA, USA. *Circulation* 140 (Suppl. 1), A16249-A16249.
- G. Spiaggia, A. Adamo, G. Cohan, W. Wagner, A. D'Amore. Biomimetic engineered chordae tendineae produced via novel mandrel-less electrospinning. Annual Scientific Meeting of the Heart Valve Society, April 11-13, 2019, Sitges, Spain. *Structural Heart*. Volume 3, 2019 - Issue 1, IF NA.
- US provisional patent application 62/868,275 filed on 07/2019, topic: biomedical device, title: "Valved stent for the treatment of severe tricuspid regurgitation."
- US provisional patent application 62/874114, filed on 07/2018, additional data filed in 10/2019, topic: biomedical device, title: "Processing method and apparatus for micro-structured rope-like material.". Lead innovator/developer: A D'Amore.
- US patent application PCT/US2019/029121 with WO (International publication number WO/2019/210059) published in 11/2019, topic: biomedical device, title: "Biodegradable metallic stent for heart valve tissue engineering". Lead innovator/developer: A D'Amore.



TEHV: Figure 1. Engineering the mitral valve. A) biaxial response of porcine aortic, pulmonary, tricuspid, mitral valve leaflets (AV, PV, TV, MV), circumferential (CD) and radial directions (RD). B) Collagen fiber diameter of porcine leaflets. Based on this characterization structure and function of the native valve and chordal apparatus can be duplicated with two novel bioprocessing techniques: Double Component Deposition (DCD) and Mandrel-Less Deposition (MLD) C) DCD controls valve mechanics: anisotropy ratio vs. mandrel tangential velocity and range of interest for the MV, ranges of interest to duplicate MV anisotropy are shown in red. D) DCD controls valve micro-structure: fiber bundle diameter vs. fabrication configurations. Native vs. engineered MV, ranges of interest to duplicate native MV bundle diameter are shown in red. Structural biomimicry for MV E) and chordae tendineae F) G) Complete engineered mitral valve with chordal apparatus. Data is presented as mean ± standard error, p<0.05.

Vasi sanguigni ingegnerizzati (TEVG)

Antonio D'Amore, PhD
adamore@fondazionerimed.com

COLLABORAZIONI

- Ospedale Cervello - Villa Sofia, Palermo, Italia
- University of Pittsburgh, Pittsburgh, Stati Uniti
- UPMC, Pittsburgh, Stati Uniti
- ATeN Center, Università di Palermo, Italia

AREA TERAPEUTICA

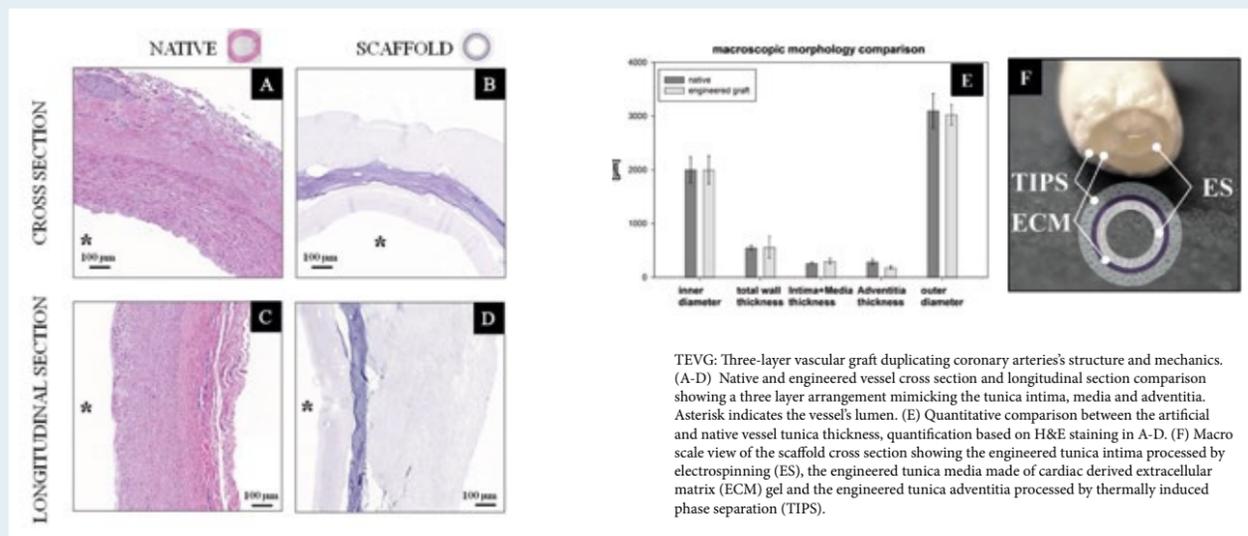
Insufficienze d'organo

PIPELINE



BREVE DESCRIZIONE

Tema: TEVG, sviluppo di vasi sanguigni ingegnerizzati da impiegare come protesi vascolare nel bypass coronarico. Le soluzioni attualmente disponibili per la sostituzione di un vaso stenotico includono l'autotrapianto, ad esempio utilizzando una porzione della vena safena, o l'impiego di materiali artificiali come Dacron e Teflon. La prima tipologia di intervento è chiaramente limitata dalla disponibilità, spesso insufficiente di tessuto autologo. La seconda, utilizza materiali sintetici che inducono una ristenoasi del vaso fino ad un 50% dei casi trattati. Queste problematiche possono essere potenzialmente risolte mediante l'approccio dell'ingegneria di tessuto. Quest'ultimo propone di sostituire il vaso compromesso con uno *scaffold* in grado di indurre crescita tissutale in situ e quindi generare tessuto autologo, funzionale e non trombo genico. In questa linea di ricerca il nostro gruppo applica l'approccio dell'ingegneria di tessuto con due obiettivi principali: progettare *scaffold* in grado di riprodurre la struttura e meccanica del tessuto nativo, ridurre l'iperplasia dell'intima mediante l'impiego di specifiche morfologie di superficie e di struttura dello *scaffold*.



IMPATTO

L'obiettivo principale di questa linea di ricerca è l'introduzione di strategie e tecnologie innovative per bypass coronarico e per il trattamento dell'ischemia degli arti inferiori. Alla luce dei limiti presentati dai vasi artificiali e dalle procedure chirurgiche attualmente utilizzate, introdurre e validare una tecnologia basata su vasi ingegnerizzati biodegradabili in grado di promuovere la crescita tissutale in situ ha un valore altamente innovativo e potenzialmente un elevato valore di mercato.

Ulteriori esempi di altre applicazioni che possono beneficiare da progressi in questa tecnologia includono l'ingegnerizzazione dell'uretere o l'endotelizzazione delle cannule utilizzate da dispositivi di classe II e III.

RISULTATI RAGGIUNTI NEL 2019

Perfezionata tecnica di fabbricazione prototipo vaso artificiale a tre strati riprodotte la struttura della tunica intima, media ed adventitia, protetta IP. Ipotizzato meccanismo per mitigare la iperplasia della tunica intima. Caratterizzate arterie coronarie native porcine. Introdotto tecnica di modifica di superficie di polimero alla micro e meso scala. Pattern imposti verranno utilizzati per manipolare cellule aderenti allo *scaffold*, brevettazione della tecnologia in corso.

Premi conseguiti

University of Pittsburgh 43rd annual Honors Convocation as outstanding faculty member.

Attività di docenza

Guest lecturer for the biomedical engineering master of science and PhD program, BIOENG 2810 - Biomaterials & biocompatibility. Department of bioengineering, University of Pittsburgh. Title: "A brief overview on polymers processing methods for soft tissue engineering".

Attività di tutoraggio

- G. C. Miceli, Milan Polytechnic Italy, biomimetic three-layers vascular graft, cell proliferation and de-novo collagen synthesis;
- A. Kelly, University of Pittsburgh, USA, topological cues for enhanced endothelial cell proliferation, cell vitality tests;
- H. Hashim, University of Palermo Italy, topological cues for enhanced endothelial cell proliferation and structural organization in engineered vascular graft;
- M. Haghkar, University of Pittsburgh USA, topological cues for enhanced endothelial cell proliferation and structural organization in engineered vascular graft;
- P. I. Gonzalez, University of Pittsburgh USA, biomimetic three-layers vascular graft.

OBIETTIVI PER IL 2020

L'obiettivo a lungo termine è la traslazione della tecnologia (Classe III FDA), gli obiettivi specifici per il 2020 sono:

- Sviluppo di vasi ingegnerizzati innovativi con i seguenti obiettivi principali:
 - Riprodurre la meccanica fisiologica di arterie e vene;
 - Crescita tissutale endogena/funzionalità del vaso/bassa trombogenicità;
 - Riduzione della iperplasia intimale;
- Caratterizzare biomeccanica delle coronarie umane, in collaborazione con la fondazione Core;
- Verificare *in vivo* il potenziale della IP sviluppata ("Multi-Layered Graft for Tissue Engineering Applications") e la sua capacità di ridurre l'iperplasia della tunica intima.

PUBBLICAZIONI

- T. K.Valencia-Rivero, J. C. Cruz, N. Wagner-Gutierrez, A. D'Amore, M. Miranda, R. López, A. Guerrero, W. Wagner, N. Sandoval, J. C. Briceño. Evaluation of Microscopic Structure-Function Relationships of PEGylated Small Intestinal Submucosa Vascular Grafts for Arteriovenous Connection. ACS Appl. Bio Mater. 2019, 2, 9, 3706-3721, IF 3.23.

PROPRIETÀ INTELLETTUALE

- US patent application PCT/US2018/061862 with WO (International publication number WO/2019/100021) published in 05/2019, topic: controlled release system/drug for angiogenesis, title: "Nitro-oleic acid (NO₂-OA) controlled release platform to induce regional angiogenesis in abdominal wall repair". Lead innovator/developer: A. D'Amore.
- US patent application PCT/US2018/043889, with WO (International publication number WO/2019/023447) published in 08/2019, topic: biomedical device, title: "Multi-Layered Graft for Tissue Engineering Applications". Lead innovator/developer: A. D'Amore.

R-CaRe - Riabilitazione per la rigenerazione della Cartilagine

Riccardo Gottardi, PhD
rgottardi@fondazionerimed.com

COLLABORAZIONI

- Orthopaedic Robotics Laboratory, University of Pittsburgh, PA, Stati Uniti
- Center for Cellular and Molecular Engineering, Dept. of Orthopaedic Surgery, University of Pittsburgh, Philadelphia, Stati Uniti
- AO Research Institute, Davos, Svizzera

AREA TERAPEUTICA

Insufficienze d'organo

PIPELINE



BREVE DESCRIZIONE

Le lesioni focali della cartilagine rappresentano una problematica importante che interessa soprattutto la popolazione attiva in età giovanile. Attualmente, il tradizionale trattamento di prima linea impiega l'uso della tecnica della microfrattura, utilizzata in oltre 100.000 casi/anno negli Stati Uniti. Tuttavia, tale tecnica presenta ancora limitazioni in termini di efficacia di lungo periodo e non sempre assicura un rapido ritorno al livello pre-lesionico. Infatti, circa il 25% delle microfratture richiede un re-intervento chirurgico entro 2 anni, con un'altra probabilità di fallimento del trattamento e uno sviluppo di patologie artritiche entro 5-10 anni. Inoltre, la riabilitazione dopo il trattamento tramite microfrattura richiede fino a 6 mesi e comprende l'immobilizzazione iniziale seguita da movimento passivo continuo e carico progressivo. Tuttavia, non vi è consenso sulle tempistiche e sull'entità dei carichi articolari che possano determinare una riabilitazione ottimale.

Poiché le forze meccaniche influenzano significativamente il comportamento cellulare (meccanobiologia), anticipare il momento in cui l'articolazione viene sottoposta a carico potrebbe migliorare la guarigione dei tessuti, accelerare la deposizione di matrice extracellulare e promuovere un fenotipo più ialino anziché fibrocartilagineo del tessuto rigenerato, come peraltro suggerito dai risultati di studi su animali e *in vitro*.

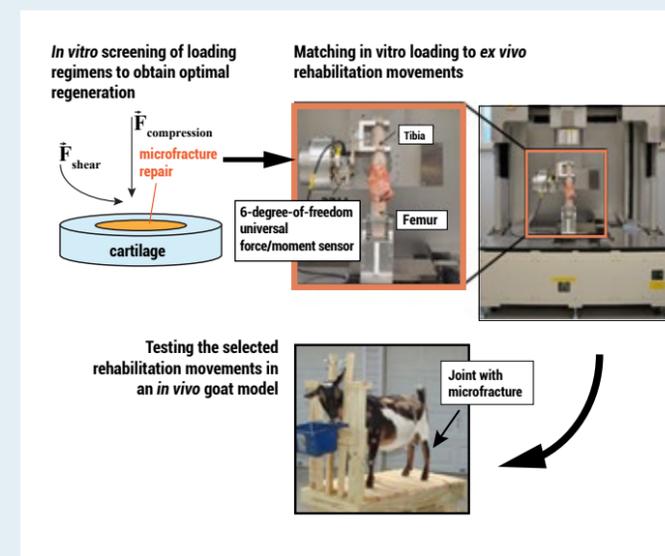
Ci aspettiamo che il carico meccanico durante la riabilitazione possa essere sfruttato per dirigere la formazione del tessuto rigenerato. Con questo progetto, miriamo a migliorare i risultati della riparazione della cartilagine identificando i regimi di carico che possono essere applicati durante la riabilitazione per promuovere la rigenerazione della cartilagine, migliorare la riparazione dei tessuti e prolungarne la longevità.

IMPATTO

Non vi è consenso clinico sulla tempistica e sull'entità del carico articolare da applicare per una riabilitazione ottimale dopo la microfrattura, poiché i meccanismi con cui la mobilitazione controllata promuove la riparazione della cartilagine sono ancora sconosciuti. I risultati ottenuti dopo il completamento delle attività previste dal progetto, forniranno un collegamento tra la meccanotrasduzione indotta dalla fisioterapia e la rigenerazione e integrazione della cartilagine di riparazione. Soprattutto, il successo di questo progetto fornirà indicazioni per modificare i protocolli di riabilitazione attuali e per estendere il tempo prima che siano necessari ulteriori trattamenti per i pazienti e, a lungo termine, posticipare lo sviluppo dell'artrosi. Come ulteriore valore aggiunto, le piattaforme tecnologiche sviluppate in questo progetto potranno essere applicate oltre che al campo della riparazione della cartilagine, anche ad altre lesioni ortopediche, nonché allo sviluppo di misure preventive basate sulla riabilitazione. Le nostre piattaforme consentono infatti un controllo preciso dei vari parametri di carico per identificare modelli di carico rigenerativo *in vitro* che possono essere replicati *in vivo* attraverso protocolli di riabilitazione sia per il trattamento sia per la prevenzione.

RISULTATI RAGGIUNTI NEL 2019

Abbiamo sviluppato un realistico modello *in vitro* di microfrattura per studiare gli effetti sulla condrogenesi del tessuto di riparazione formato in seguito ad intervento di microfrattura, sia del movimento passivo continuo sia del carico progressivo simulati attraverso specifici bioreattori. I nostri studi *in vitro* su un modello di microfrattura suggeriscono che il carico compressivo (che modella il carico progressivo dell'articolazione) promuove un migliore tessuto di riparazione, un fenotipo più ialino e una migliore integrazione con la cartilagine circostante, rispetto al carico di



taglio (che modella il movimento passivo continuo). Inoltre, il carico di taglio ha indotto la sovraregolazione dei marcatori catabolici, suggerendo un rimodellamento più significativo. I nostri risultati sull'effetto positivo del carico di compressione sono ulteriormente supportati da osservazioni su animali di grandi dimensioni che iniziano il pieno carico immediatamente dopo la microfrattura. Questa ricerca è stata sostenuta dal finanziamento pilota dell'Alliance for Regenerative Rehabilitation Research and Training.

OBIETTIVI PER IL 2020

Nel 2020 miriamo ad ottenere ulteriori finanziamenti al fine di identificare se e come la meccanotrasduzione pro-rigenerativa possa essere applicata localmente mediante un esercizio di riabilitazione sull'intera articolazione. Miriamo a stabilire un framework multiscala per la progettazione di superiori regimi di riabilitazione che potrebbero poi essere applicati allo studio della riabilitazione rigenerativa in modelli animali di grandi dimensioni e in studi clinici. Ci concentreremo in particolare sull'identificazione della combinazione di carico di compressione e taglio che promuove cartilagine di riparazione più ialina e meglio integrata, modellando diversi protocolli di riabilitazione. Quindi abbineremo l'esercizio simulato ai movimenti di riabilitazione equivalenti nelle ginocchia umane usando un sistema di test robotico a sei assi con feedback di posizione e forza che consente condizioni di carico realistiche. I sensori di forza posizionati artroscopicamente e la modellazione avanzata agli elementi finiti serviranno per identificare il carico locale sulla cartilagine in funzione della posizione nell'articolazione. L'analisi servirà a identificare nelle ginocchia umane il protocollo riabilitativo che corrisponderebbe *in vivo* a quelli vagliati *in vitro*.

CONFERENZE

- Biomechanical Engineering Society - BMES, Ottobre 2019, Philadelphia (PA), USA
- American Orthopaedic Society for Sports Medicine, AOSSM Annual Meeting, Luglio 2019, Boston (MA), USA
- Tissue Engineering and Regenerative Medicine - EU (TERMIS EU), Maggio 2019, Rodi, Grecia
- CWRU Center for Multimodal Evaluation of Engineered Cartilage, Investigator's Meeting, Maggio 2019, Cleveland (OH), USA
- Orthopaedic Research Society Annual Meeting, Febbraio 2019, Austin (TX), USA

PUBBLICAZIONI

- Iseki T., Rothrauff B.B., Kihara S., Sasakin H., Yoshiya S., Fu H.F., Tuan R.S., Gottardi R. 2019. Dynamic Compressive Loading Improves Cartilage Repair in an In Vitro Model of Microfracture: Comparison of 2 Mechanical Loading Regimens on Simulated Microfracture Based on Fibrin Gel Scaffolds Encapsulating Connective Tissue Progenitor Cells. The American Journal of Sports Medicine, 47, 2188-2199 <https://doi.org/10.1177/0363546519855645>
- Gottardi R. Load-induced osteoarthritis on a chip. Nature Biomedical Engineering, 2019, 3(7):502-503, DOI: 10.1038/s41551-019-0427-y



PIATTAFORME TECNOLOGICHE

L'approccio fortemente orientato alla traslationalità, prevede lo sviluppo di competenze e piattaforme tecnologiche a supporto dei progetti di discovery e sviluppo preclinico.

Nel corso del 2019 le piattaforme sono state potenziate grazie a **CheMIST**, finanziamento regionale che ha permesso ai gruppi di **Bioinformatica** e **Chimica Computazionale** di aumentare le prestazioni di calcolo con hardware e software che raggiungono velocità di screening virtuale di 5000 molecole al minuto, integrati con gli algoritmi proprietari per lo studio delle interazioni molecolari a livello cellulare e con l'infrastruttura per l'analisi delle proprietà chimicofisiche. Chemist ha inoltre permesso l'acquisto di un sistema automatizzato per la conservazione e manipolazione di librerie di molecole per il laboratorio **High Throughput Screening**, nonché di un simulatore cardiaco e di strumentazioni per la caratterizzazione di biomateriali e dispositivi medici, che il gruppo di **Bioingegneria** utilizza per lo sviluppo di nuove soluzioni per i pazienti.

La piattaforma di **Biofisica e Biologia strutturale**, dedicata alla produzione e purificazione e allo studio tridimensionale delle proteine di interesse terapeutico, può vantare uno spettrometro di risonanza magnetica a 800 MHz, unico nel Sud Italia, acquisito nell'ambito del progetto POR "**Infrastrutture di Ricerca**" ed installato nel 2019.

Alcune piattaforme Ri.MED sono operative presso l'IRCCS ISMETT, nell'ottica "from bench to bedside" alla base del cluster. La piattaforma di **Magnetic Resonance Imaging** si avvale di spettrometri a 3T e 7T e competenze per l'analisi di dati e immagini multimodali, per la diagnosi predittiva di patologie e recidive. Il gruppo di **Proteomica** supporta l'identificazione di nuovi *target* farmacologici e di biomarcatori, nonché lo studio di potenziali effetti collaterali di particolari molecole terapeutiche. È inoltre presente una **Cell factory** per la produzione di ATMP, che è stata rinnovata nel corso del 2019 ed è attualmente in fase di verifica, ambendo a diventare a breve la prima cell factory autorizzata AIFA nel sud Italia.



Bioinformatica

Bioingegneria

Biologia strutturale e biofisica

Computer Aided Drug Design

High-throughput Screening (HTS)

Magnetic Resonance Imaging

Proteomica

Cell Factory

Piattaforma di Bioinformatica

CONTATTI:
Claudia Coronello, PhD
ccoronello@fondazionerimed.com

Il gruppo di Bioinformatics and Data Analysis è rivolto a supportare i ricercatori e i collaboratori della Fondazione RI.MED nell'ottenere la maggiore informazione possibile dai loro dati scientifici, con un particolare interesse per i Big Data. Ad esempio, supportiamo l'unità di Drug Discovery con la creazione di strumenti informatici per il compound management e per l'analisi dei dati da high throughput screening.

Eseguiamo le analisi statistiche comunemente utilizzate sui high-throughput data ottenuti da un ampio range di tecnologie, come microarray e Next Generation Sequencing, integrando l'analisi con i dati clinici ove presenti. Spesso le analisi standard non sono applicabili, perché i software e gli algoritmi esistenti non prevedono il disegno sperimentale pensato. In questi casi, sfruttiamo le nostre capacità di programmazione e gestione di big data per analizzare gli high-throughput data in maniera personalizzata. Principale oggetto di interesse del gruppo sono le reti di interazioni biologiche, analizzate integrando l'analisi di più sorgenti di dati. Ad esempio, siamo in grado di descrivere la rete di regolazione genica dei microRNA endogeni in un particolare tessuto di interesse, sfruttando il loro profilo di espressione genica.

COLLABORAZIONI:

- IRIB-CNR, Palermo, Italia
- Università degli Studi di Palermo
- University of Pittsburgh, Stati Uniti
- IRCSS-ISMETT, Palermo, Italia

4264	2615	15618	13233	17192	16093	16208	22978	9559	16621	16629	4543	11884	10779	4545	11939	13998	2444	12364	14436	14814	27676	14281	13758
4600	2543*	55388	16822	16144	15778	13325	16019	14040	14575	12929	14535	8999	9274	13177	11827	12319	14190	13439	3152	46985	13412	12911	13154
6110	2610	11650	12067	15445	16578	15821	15474	14351	16736	13660	15558	11410	13904	13770	14483	33580	14031	5147	14224	9486	12968	14377	15322
6337	2637	17541	18921	16783	34824	14840	16313	4401	53066	15096	13781	10602	12045	13504	11245	14855	13944	15420	17901	13059	13197	14693	13512
8379	2872	13032	15366	15709	15718	16038	15832	15857	12401	13480	14636	10890	12587	11642	12745	13830	13737	11803	25044	15418	13046	13329	14309
19608	2663	15130	16256	16359	16030	12294	13785	14924	22570	16096	2278	9115	11611	9637	12910	10959	16376	14726	11796	14406	14745	11680	13056
11281	2816	10515	16878	7465	15978	15302	13631	16601	15161	21726	13162	9803	11643	11958	14150	13883	14472	11771	8008	10989	14468	13109	14470
9889	2538	13787	16407	13812	13663	21985	36873	14072	2366	8472	15110	12500	2677	12367	14901	14155	14368	13140	50266	11824	13506	12295	15416
7464	2649	23082	15655	9604	16668	16037	14261	15610	13233	11025	35194	10845	11834	27705	13794	12923	3818	11516	13825	12538	12655	13952	15002
6741	2735	10245	9503	16398	37993	18784	14577	12919	15471	3054	3744	10837	3529	12978	11201	12231	12059	14499	13980	12608	13575	14586	13719
8687	2727	19429	15864	14548	16823	15891	5625	19131	14667	16213	13482	11276	12455	14174	15970	13134	13684	13112	13138	12919	12716	13083	12883
19412	2826	16243	17558	9518	16357	22227	12605	14097	15924	18246	17745	12608	27950	14372	13600	16445	12974	13717	15052	14988	5999	13641	13653
10380	2622	15333	17777	6138	16000	15517	17038	15956	7366	15277	17363	7438	14546	13936	51778	11726	13548	14067	30200	13207	14674	12532	13336
11711	2621	15744	14009	16134	13331	15269	19779	15458	14712	17402	14202	10954	13015	13524	13719	13539	10909	14066	15395	15913	13567	12305	13311

Competenze

- Statistica descrittiva e inferenziale.
- Statistica descrittiva e inferenziale.
- Analisi di high-throughput data, i.e. Next Generation Sequencing o tecnologie basate su microarray.
- Algoritmi predittivi basati su Machine Learning
- Gestione e analisi di Big Data
- Network analysis

Dotazione tecnologica

Software

Gli script per l'analisi dei dati sono generalmente realizzati in linguaggi open-source, come R e le librerie di Bioconductor. Per la visualizzazione delle reti di interazione utilizziamo Pajek e Cytoscape. Realizziamo e condividiamo pipeline di analisi dati mediante l'utilizzo del software Knime. Per venire incontro alle esigenze dei collaboratori, abbiamo anche la possibilità di analizzare i dati biologici con il software Ingenuity **Pathway Analysis**.

Hardware

- 3 workstation
- Server: 80 CPUs e 2 x NVIDIA Tesla K80



PROGETTI DI RICERCA ATTIVI

Il gruppo, oltre a supportare ove necessario i progetti di ricerca di altri ricercatori Ri.MED, è attualmente coinvolto in progetti finalizzati alla realizzazione di algoritmi utili per l'analisi della rete di regolazione genica ad opera dei microRNA.

Rete di interazioni microRNA-mRNA: E' nostro obiettivo sviluppare algoritmi per modellizzare, visualizzare e confrontare le reti di interazione tra microRNA e *target* di tessuti diversi. Stiamo istruendo e testando gli algoritmi utilizzando i profili di espressione di geni e microRNA contenuti del database The Cancer Genome Atlas (TCGA), che include dati relativi a migliaia di pazienti oncologici.

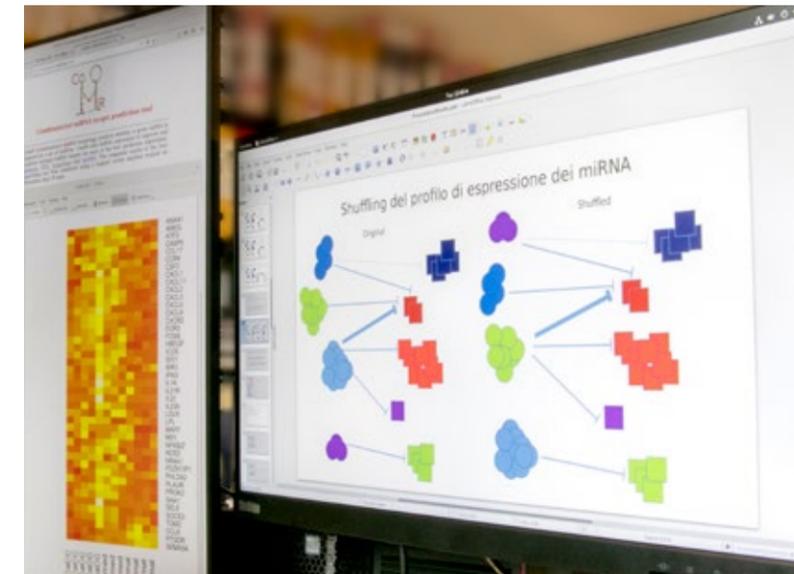
Predizione di esperimenti RIP-Chip con proteine del complesso RISC: Abbiamo realizzato un algoritmo basato su machine learning utile per predire i geni differenzialmente espressi nel campione RIP-Chip. Tale algoritmo è al momento ottimizzato per predire l'esito di esperimenti RIP-Chip condotti con le proteine AGO1, AGO2 e GW182.

PUBBLICAZIONI

Nazzicari N, Vella D, Coronello C, Di Silvestre D, Bellazzi R, Marini S (2019) MTGO-SC, A Tool to Explore Gene Modules in Single-Cell RNA Sequencing Data, *Frontiers in genetics* 10

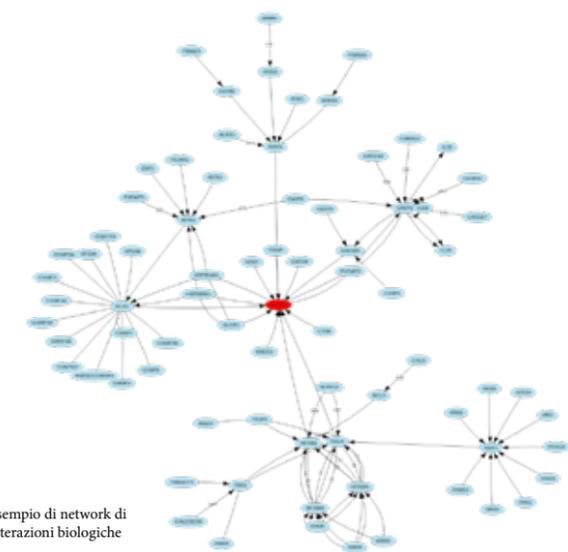
Badami E, Coronello C, Barbera F, Paini DS, Conaldi P (2019) NK cell anti-tumor and anti-viral function can be enhanced *in vitro* and exploited for successful cell mediated therapy, *Cytotherapy* 21(5)

Perconti G, Contino F, Rubino P, Bivona S, G Bertolazzi, M Tumminello, Feo S, Giallongo A, Coronello C. (2019) AGO2 and GW182 IP show different characteristics in co-immunoprecipitated RNA features, *BMC Bioinformatics*, 20 (4).



Bellavia D, Iacovoni A, Agnese V, Falletta C, Coronello C, Pasta S, Novo G, Di Gesaro G, Senni M, Maalouf J, Sciacca S, Pilato M, Simon M, Clemenza F, Gorcsan III J (2019) Usefulness of regional right ventricular and right atrial strain for prediction of early and late right ventricular failure following a left ventricular assist device implant: A machine learning approach, *The International Journal of Artificial Organs*, <https://doi.org/10.1177/0391398819884941>

Kvorjak M, Ahmed Y, Miller ML, Sriram R, Coronello C, Hashash JG, Hartman DJ, Telmer CA, Miskov-Zivanov N, Finn OJ and Cascio S (2019) Crosstalk between colon cells and macrophages increases ST6GALNAC1 and MUC1-sTn expression in ulcerative colitis and colitis-associated colon cancer, *Cancer Immunol Res*, DOI:10.1158/2326-6066.CIR-19-0514



Esempio di network di interazioni biologiche

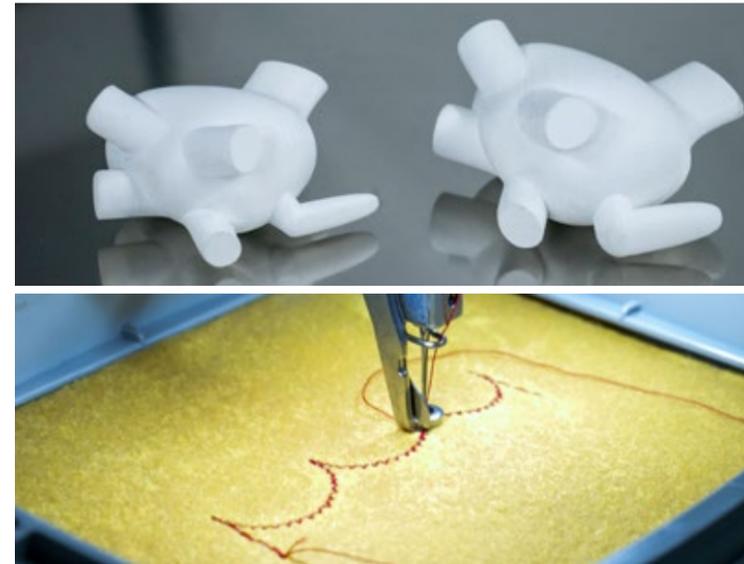
Piattaforma di Bioingegneria

CONTATTI:
Gaetano Burriesci, PhD
gburriesci@fondazionerimed.com

L'attività dell'unità di Bioingegneria è focalizzata sullo sviluppo e il trasferimento nella pratica clinica di soluzioni biomediche innovative, mirate al miglioramento dell'efficacia e sostenibilità del servizio sanitario, con ricaduta immediata sulla qualità della vita del paziente. Queste innovazioni includono dispositivi medici basati sull'applicazione dei recenti sviluppi emersi dalle scienze dei materiali e dalla medicina rigenerativa; processi decisionali olistici paziente-specifico e strumenti diagnostici non-invasivi; approcci di medicina mini-invasiva e personalizzata. L'unità è in fase di forte espansione, e sta implementando una piattaforma tecnologica che consente il trattamento e la caratterizzazione di biomateriali, la simulazione numerica di sistemi fisiologici complessi e la validazione preclinica di dispositivi medici delle varie classi di rischio (da classe I - a classe III). Il personale tecnico-scientifico offre solide competenze nella modellazione numerica, nell'analisi fluido-strutturale, nell'ottimizzazione progettuale dei dispositivi medici e nella conduzione delle verifiche precliniche, basate sui requisiti regolamentari e sulla good practice. Nel medio termine, l'unità ambisce ad affermarsi come riferimento per gli enti del sistema sanitario, i centri accademici e le piccole e medie imprese sul territorio, stimolando la produzione di innovazione clinica da parte dalle eccellenze locali ed offrendo percorsi di crescita per nuove competenze tecniche e gestionali nel settore.

COLLABORAZIONI:

- Barts Heart Centre at St Bartholomew's Hospital, Londra, GB
- École polytechnique fédérale de Lausanne, Losanna CH
- Great Ormond Street Hospital for Children, Londra, GB
- IRCCS ISMETT, Palermo, ITA
- Mines Saint Etienne, FRA
- Politecnico di Milano, ITA
- IRCCS Policlinico San Donato, ITA
- Università degli studi di Padova, ITA
- Università degli Studi di Palermo, ITA
- Université de Technologie de Compiègne, FRA
- University of Pittsburgh, Stati Uniti
- University College London, Londra, GB



Competenze

- Sviluppo di dispositivi impiantabili cardiovascolari.
- Caratterizzazione meccanica e termo-meccanica dei biomateriali.
- Simulazione numerica dei sistemi fisiologici e della loro interazione con dispositivi medici (mediante analisi strutturali, fluidodinamiche, e di interazione fluido-strutturale).
- Sviluppo di processi decisionali olistici paziente-specifico.
- Identificazione di marcatori prognostici non-invasivi per il monitoraggio e la diagnosi di patologie cardiovascolari.
- Caratterizzazione idrodinamica *in vitro* di sistemi fisiologici e dispositivi cardiovascolari impiantabili.
- Stima della vita utile di dispositivi cardiovascolari impiantabili

Dotazione tecnologica

- Codici per la simulazione numerica di sistemi fisiologici complessi;
- Apparecchiature per il trattamento e la caratterizzazione di biomateriali e biofluidi;
- Strumenti per la produzione di base di componenti e prototipi;
- Strumenti per la validazione preclinica di dispositivi medici cardiovascolari



PROGETTI DI RICERCA ATTIVI

- Previsione del rischio dello scompenso del ventricolo destro in pazienti con ipertensione polmonare e dispositivi di assistenza ventricolare (VAD)
- Sviluppo di una valvola cardiaca transcateretere innovativa
- Sviluppo di una valvola cardiaca in tessuto animale priva di Alfa-Gal
- Analisi dell'appendice atriale sinistra per la predizione il rischio di trombosi
- Predizione del potenziale di lesioni ischemiche a seguito di terapie cardio-valvolari
- Simulazione *in vitro* di terapie della valvola mitrale
- Modellazione *in silico* per la stratificazione del rischio clinico di patologie cardiovascolari

PUBBLICAZIONI

- Annio G., Franzetti G., Bonfanti M., Gallarello A., Palombi A., De Momi E., Homer-Vanniasinkam S., Wurdemann H.A., Tsang V., Diaz-Zuccarini V., Torii R., Balabani S., Burriesci G. (2019) **Low cost fabrication of PVA based personalized vascular phantoms for *in vitro* haemodynamic studies: three applications.** ASME Journal of Engineering and Science in Medical Diagnostics and Therapy, n. JESMDT-19-1037. <https://doi.org/10.1115/1.4045760>
- Nazzicari N., Vella D., Coronello C., Di Silvestre D., Bellazzi R., Marini S. (2019) **MTGO-SC, a tool to explore gene modules in single cell RNA-seq data.** Front. Genet. doi:10.3389/fgene.2019.00953
- Annio G., Torii R., Ariff B., O'Regan D.P., Muthurangu V., Ducci A., Tsang V., Burriesci G. (2019) **Enhancing Magnetic Resonance Imaging with Computational Fluid Dynamics.** ASME Journal of Engineering and Science in Medical Diagnostics and Therapy. doi: <https://doi.org/10.1115/1.4045493>
- Salmons-Smith J., Ducci A., Burriesci G. (2019) **Does Transcatheter Aortic Valve Alignment Matter?** Open Heart 6:e001132. doi:10.1136/openhrt-2019-001132
- Agnese V., Pasta S., Michelena H.I., Minà C., Romano G.M., Carerj S., Zito C., Maalouf J.F., Foley T.A., Raffa G., Clemenza F., Pilato M., Bellavia D. (2019) **Patterns of ascending aortic dilatation and predictors of surgical replacement of the aorta: A comparison of bicuspid and tricuspid aortic valve patients over eight years of follow-up.** Journal of Molecular and Cellular Cardiology 135:31-39

- McGregor C., Rahmani B., Chisari E., Kyriakopoulou K., Burriesci G., Byrne G. (2019) **Initial validation of Gal knockout pig tissues as materials for biological heart valves.** XENOTRANSPLANTATION 26(5):401-2.
- Di Micco L., Peruzzo P., Colli A., Burriesci G., Boso D., Besola L., Gerosa G., Susin F.M. (2019) **The Neochord Mitral Valve Repair Procedure: Numerical Simulation of Different Neochords Tensioning Protocols.** Medical Engineering & Physics 74:121-128. doi: <https://doi.org/10.1016/j.medengphy.2019.09.014>
- D'Acquisto L., Scardulla F., Montinaro N., Pasta S., Zangla D., Bellavia, D. (2019) **A preliminary investigation of the effect of contact pressure on the accuracy of heart rate monitoring by wearable PPG wrist band.** 2019 IEEE International Workshop on Metrology for Industry 4.0 and IoT, MetroInd 4.0 and IoT 2019 - Proceedings 8792834:334-338
- Peruzzo P., Burriesci G., Susin M.F., Colli A. (2019) **In vitro and ex-vivo Hemodynamic Testing of an Innovative Occluder for Paravalvular Leak after Transcatheter Aortic Valve Implantation.** Journal of Cardiovascular Translational Research 12(6):551-559. doi: <https://doi.org/10.1007/s12265-019-09902-4>.
- Gallarello A., Palombi A., Annio G., Homer-Vanniasinkam S., De Momi E., Maritati G., Torii R., Burriesci G., Wurdemann H.A. (2019) **Patient-specific aortic phantom with tunable compliance.** ASME J of Medical Diagnostics 2(4):041005.
- Cosentino F., Agnese V., Raffa G.M., Gentile G., Bellavia D., Zingales M., Pilato M., Pasta S. (2019) **On the role of material properties in ascending thoracic aortic aneurysms.** Computers in Biology and Medicine 109:70-78.
- Palombi A., Bosi G., Di Giuseppe S., De Momi E., Homer-Vanniasinkam S., Burriesci G., Wurdemann H. (2019) **Sizing the aortic annulus with a robotised, commercially available soft balloon catheter: in vitro study on idealised phantoms.** Proceedings of the IEEE International Conference on Robotics and Automation 2019, TuCT1-12.5.
- Peruzzo P., Susin F.M., Colli A., Burriesci G. (2019) **In-vitro assessment of pacing as therapy for aortic regurgitation.** Open Heart, 6:e000976. doi: 10.1136/openhrt-2018-000976.
- Cosentino F., Scardulla F., D'Acquisto L., Agnese V., Gentile G., Raffa G., Bellavia D., Pilato M., Pasta S. (2019) **Computational modeling of bicuspid aortopathy: Towards personalized risk strategies.** Journal of Molecular and Cellular Cardiology 131:122-131.
- D'Ascenzo F., Salizzoni S., Saglietto A., Cortese M., Latib A., Franzone A., Barbanti M., Nietlispach F., Holy E.W., Burriesci G., De Paoli A., Foino P., Atzeni F., Moretti C., D'Amico M., Rinaldi M., Conrotto F. (2019) **Incidence, predictors and cerebrovascular consequences of leaflet thrombosis (LT) after transcatheter aortic valve implantation (TAVI): a systematic review and meta-analysis.** European Journal of Cardio-Thoracic Surgery, ezz099.
- Rahmani B., McGregor C., Byrne G., Burriesci G. (2019) **A Durable Porcine Pericardial Surgical Bioprosthetic Heart Valve: a Proof of Concept.** Journal of Cardiovascular Translational Research, 12(4):331-337. <https://doi.org/10.1007/s12265-019-09868-3>.
- Di Giuseppe M., Alotta G., Agnese V., Bellavia D., Raffa G.M., Vetri V., Zingales M., Pasta S., Pilato M. (2019) **Identification of circumferential regional heterogeneity of ascending thoracic aneurysmal aorta by biaxial mechanical testing.** Journal of Molecular and Cellular Cardiology 130:205-215.
- Provaggi E., Capelli C., Rahmani B., Burriesci G., Kalaskar D. M. (2019) **3D printing assisted finite element analysis for optimising the manufacturing parameters of a lumbar fusion cage.** Materials and Design, 163:107540.

Piattaforma di Biologia Strutturale e Biofisica

CONTATTI:
Caterina Alfano, PhD
calfano@fondazionerimed.com

Il gruppo di biologia strutturale e biofisica mira a fornire informazioni biofisiche e strutturali sui fenomeni biologici guidati dal ripiegamento, dall'aggregazione e dall'interazione di proteine con l'obiettivo finale di comprendere i meccanismi molecolari alla base di gravi patologie. La piattaforma supporta inoltre l'unità di Drug Discovery per lo screening e l'identificazione di **hits e leads**.
Il gruppo utilizza un approccio interdisciplinare che combina tecniche biofisiche all'avanguardia - come risonanza magnetica nucleare, calorimetria, interferometria e cristallografia a raggi X - integrate da consolidate competenze tecniche e metodologiche in biologia molecolare e scienza delle proteine. L'uso integrato di questa varietà di tecniche biofisiche e biochimiche ci consente di caratterizzare le proprietà intrinseche di proteine bersaglio, i loro complessi e le interazioni in cui sono coinvolte, guidandoci così nella comprensione dei meccanismi molecolari alla base di gravi patologie e nell'ideazione di possibili strategie di intervento. L'Unità svolge diversi progetti di ricerca in diverse aree terapeutiche come malattie da invecchiamento, cancro e malattie infettive. La diversità di tutti i progetti di ricerca attivi rappresenta il potenziale della biologia strutturale, che può essere applicata sia alla ricerca di base che alla ricerca traslazionale e può supportare trasversalmente diverse attività di ricerca.

COLLABORAZIONI:

- King's College London
- TES Pharma, Perugia
- Università degli Studi di Perugia
- Università degli studi della Campania Luigi Vanvitelli
- Università degli Studi di Palermo
- Istituto di Biofisica - CNR



Competenze

- Produzione di proteine ricombinanti: dal clonaggio alla purificazione e caratterizzazione;
- Determinazione delle dimensioni, della struttura e della stabilità di macromolecole;
- Studi strutturali, cinetici e termodinamici di interazioni proteina-proteina e proteina-ligando;
- BLI-based and NMR-based fragment screening;
- Sviluppo e applicazione di metodi analitici.

Dotazione tecnologica

- Wet lab per clonaggio, espressione e purificazione di proteine ricombinanti;
- Spettrometro NMR operante ad 800 MHz con crio-sonda a tripla risonanza;
- Calorimetro per calorimetria isoterma di titolazione;
- Bio-Layer Interferometro;
- CD Spettropolarimetro.

PROGETTI DI RICERCA ATTIVI

- Studio dei meccanismi molecolari alla base delle patologie da *misfolding* proteico.
- Delucidazione dei meccanismi di legame di molecole in grado di interferire con il processo di oligomerizzazione di NPM1.
- Sviluppo di molecole adesive bio-ispirate in grado di funzionare in ambienti acquosi.
- Studi strutturali e biofisici su proteine coinvolte nella regolazione epigenetica di patologie tumorali (SIRT1, KDM4).



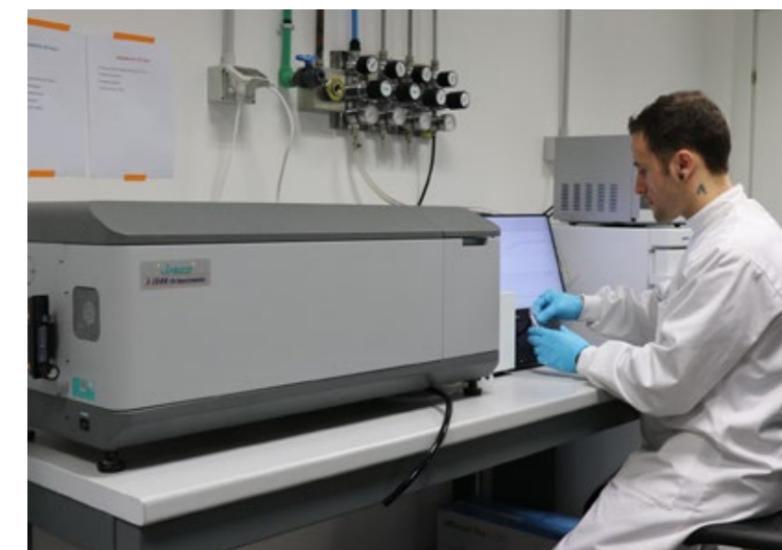
- Ruolo dell'interazione alpha-sinucleina/membrane nel morbo di Parkinson.
- Produzione di proteine da *Klebsiella pneumoniae* per lo sviluppo di vaccini.
- BLI- and NMR-based fragment screening.
- Impatto del *crowding* molecolare nel *folding* di proteine.

PUBBLICAZIONI

Santonocito R., Venturella F., Dal Piaz F., Morando M.A., Provenzano A., Rao E., Costa M., Bulone D., San Biagio P.L., Giacomazza D., Sico-rellino A., Alfano C.*, Passantino R.*, Pastore A. (2019) Recombinant mussel protein Pvfp-5 β : a potential tissue bioadhesive. *J Biol Chem.* 294(34):12826-12835. *Co-corresponding authors.

Fricano A., Librizzi F., Rao E., Alfano C., Vetri V. (2019) Blue autofluorescence in protein aggregates "lighted on" by UV induced oxidation. *BBA - Proteins and Proteomics* 1867(11):140258.

Zacco E., Graña-Montes R., Martin S.R., de Groot N.S., Alfano C., Tartaglia G.G., Pastore A. (2019) RNA as a key factor in driving or preventing self-assembly of the TAR DNA-binding protein 43. *J Mol Biol.* 431(8):1671-1688.



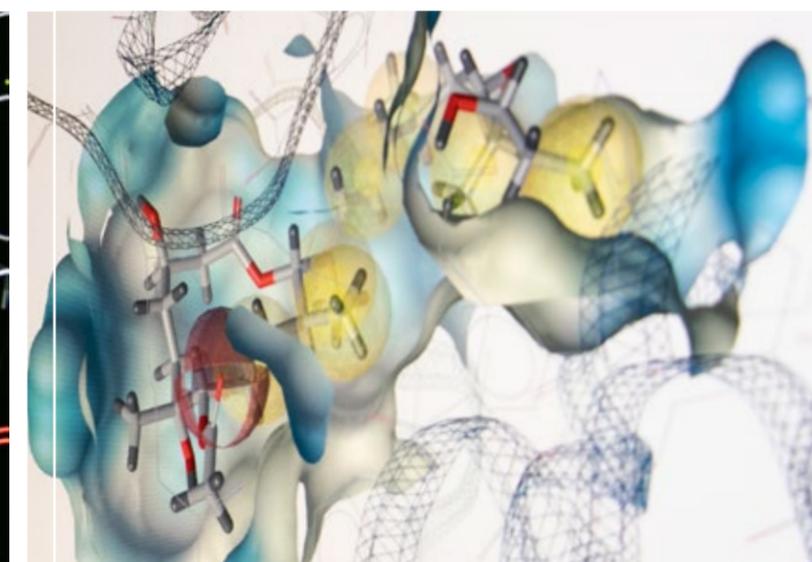
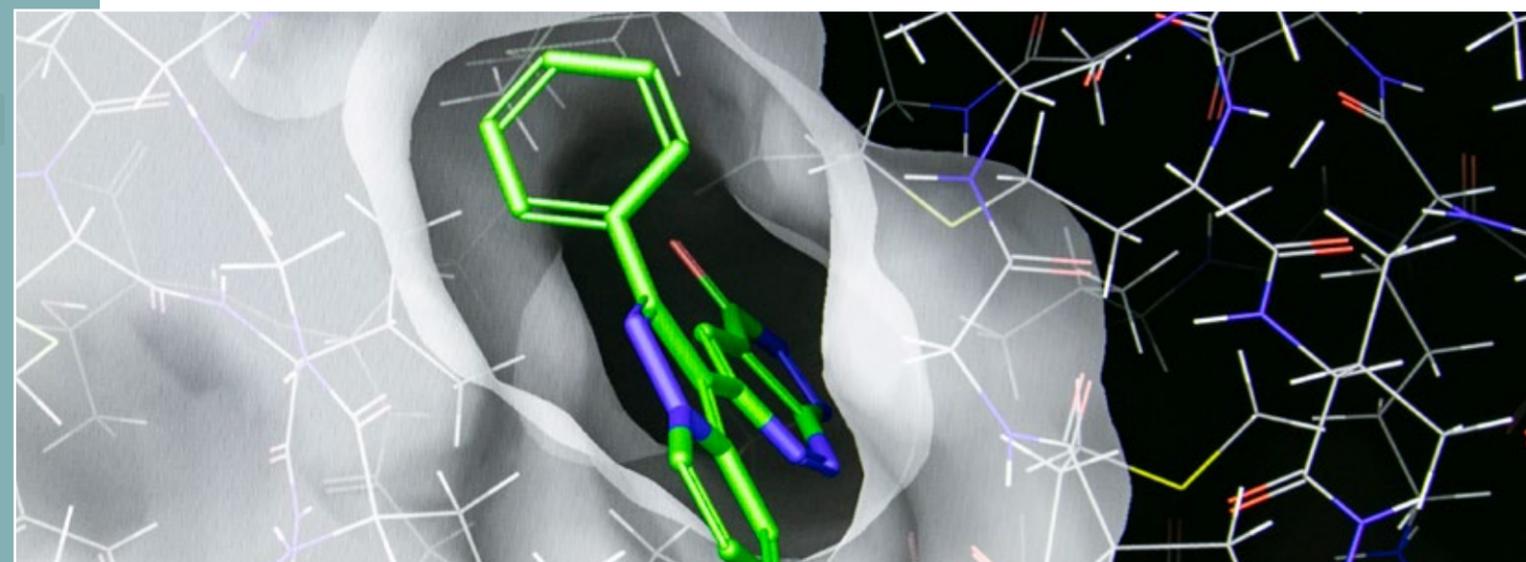
Piattaforma di Computer Aided Drug Design

CONTATTI:
Ugo Perricone, PhD
uperricone@fondazionerimed.com

Il gruppo di Computer Aided Drug Design (CADD) della Fondazione Ri.MED si occupa principalmente dell'identificazione e dell'ottimizzazione di molecole biologicamente attive attraverso l'uso di tecniche *in silico* solitamente impiegate per screening virtuali o per differenti approcci chemoinformatici. Il team ha maturato negli anni diverse esperienze nel campo della chimica medicinale e della chimica computazionale. L'expertise acquisita dai membri del team viene sinergicamente sfruttata per la creazione di librerie molecolari, creare e convalidare modelli teorici affidabili da utilizzare per i successivi screening virtuali di ligandi (VS). I risultati ottenuti attraverso i modelli creati vengono ulteriormente validati sperimentalmente attraverso saggi biologici o biofisici. Il gruppo di chimica computazionale è anche coinvolto nell'esplorazione dello spazio chimico e nell'ottimizzazione dei processi di arricchimento delle librerie molecolari virtuali disponibili da utilizzare per campagne di screening in modalità High-Troughput (HTS). Nell'ultimo anno, la collaborazione con il gruppo di ingegneria informatica di Palermo, ha permesso lo sviluppo di approcci basati su l'uso di intelligenza artificiale per la predizione di attività e tossicità di **small molecules** biologicamente attive.

COLLABORAZIONI:

- Institut de La Vision, Parigi, Francia
- Institute of Oncology Research (IOR), Svizzera
- Università di Vienna (Dip. di Chimica Farmaceutica), Austria
- University of Pittsburgh, Stati Uniti
- Università di Napoli Federico II, Italia
- IRIB-CNR, Palermo, Italia
- Università di Palermo, Italia



Competenze

- Virtual screening structure-based (Docking e Approccio farmacoforico)
- Virtual screening ligand-based (farmacoforo, modelli basati su descrittori molecolari, QSAR e 3D QSAR)
- Dinamica molecolare
- Farmacoforo dinamico (tecnica ibrida basata sull'utilizzo di farmacofori generati sulle traiettorie di dinamica molecolare)
- Creazione e gestione di Database molecolari
- Data mining applicato a problematiche legate alla chimica medicinale
- Neural Network in Drug Design

Dotazione tecnologica

Software

- Schrodinger suite for small molecule drug discovery
- Cambridge Crystallographic Data Centre suite (CCDC)
- LigandScout expert suite
- Autodock and Autodock Vina
- Desmond (OPLS3 and OPLS3e)
- AMBER
- NAMD
- VMD
- Gromacs
- RDKit
- KNIME

Hardware

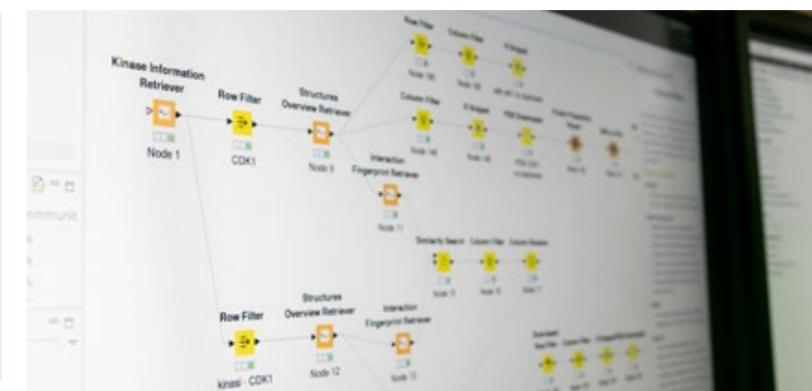
- 6 Workstations
- Server in HPC mode: 200 CPUs e 2 x NVIDIA Tesla K80

Capacità di calcolo:

- Library optimisation → ~ 6,000 molecole/min
- Virtual Screening HTVS → ~ 5,000 molecole /min
- Virtual screening SP → ~ 1,500 molecole /min
- Molecular Dynamics → ~ 200 ns/giorno/scheda (su un sistema medio di 40,000 atomi)

Piattaforma integrata *in silico*

Il gruppo sta realizzando una piattaforma integrata per lo studio dei network molecolari in collaborazione con il gruppo di bioinformatica.



PROGETTI DI RICERCA ATTIVI

- Progettazione di inibitori selettivi del **target CD14** coinvolto nella maculopatia degenerativa legata all'età
- Progettazione di inibitori di **NLRP3** quale **target** della patologia infiammatoria
- Ricerca di modulatori di proteine coinvolte nella regolazione epigenetica della patologia tumorale (**KDM4, EZH2**)
- Progettazione e sviluppo di inibitori della **CDK1** coinvolta nelle patologie tumorali.
- Ricerca di **target** e modulatori dell'attività antiproliferativa in cellule di tumore alla prostata in cellule "**Pten-null**"
- Progettazione di modulatori di **EPHB4** nella patologia tumorale
- Progettazione modulatori dell'interazione proteina-proteina con particolare riferimento ai complessi **MUC1-CIN85**

PUBBLICAZIONI

Mekni N., De Rosa M., Cipollina C., Gulotta M.R., De Simone G., Lombino J., Padova A., Perricone U., *In silico* insights towards the identification of NLRP3 druggable hot spots, Int. J. Mol. Sci. 2019, DOI: 10.3390/ijms20204974.

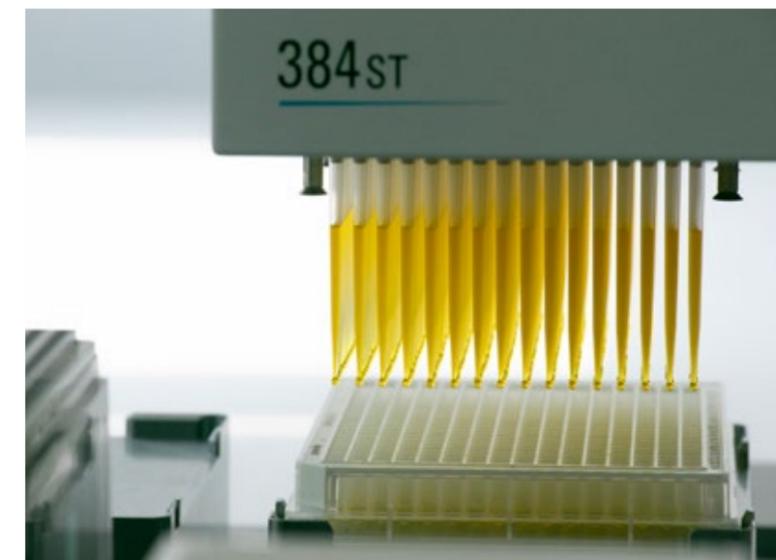
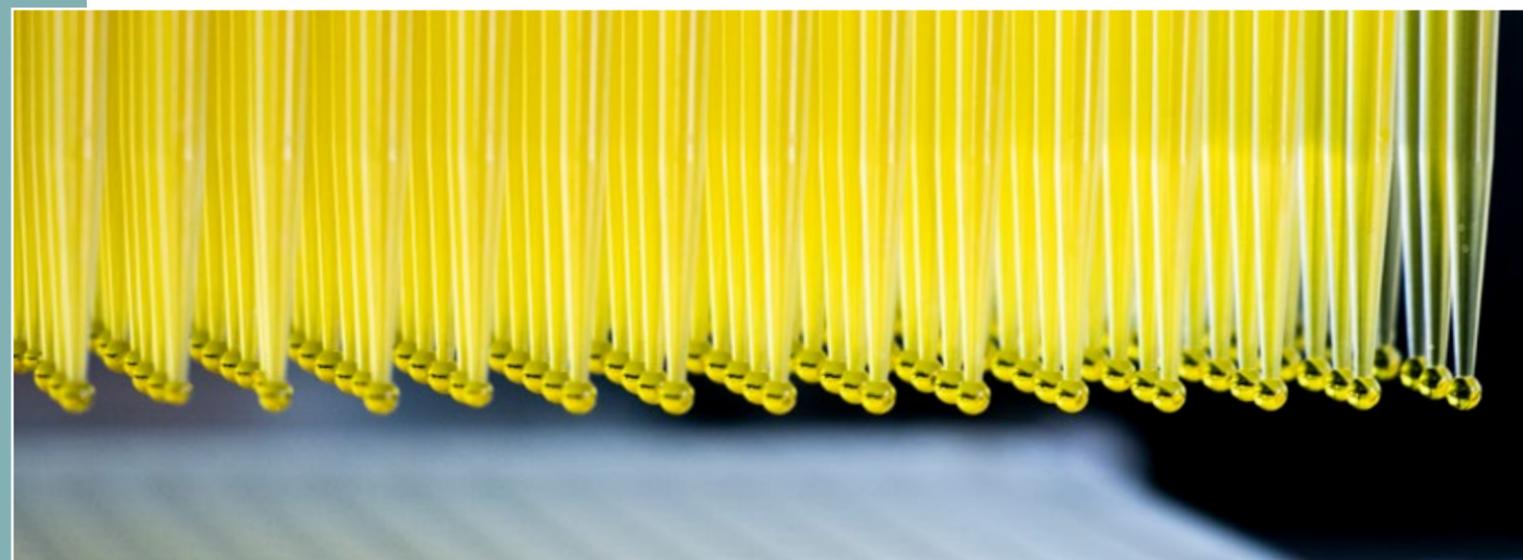
Mendolia I., Contino S., Perricone U., Pirrone R., Ardizzone E., A Convolutional Neural Network for Virtual Screening of Molecular Fingerprints, ICIAP 2019, (Book Chapter), DOI: 10.1007/978-3-030-30642-7_36

Perricone U., Gulotta M.R., Lobino J., Parrino B., Cascioferro S.M., Diana P., Cirrincione G., Padova A., An overview of recent Molecular Dynamics applications as medicinal chemistry tool for undruggable sites challenge, MedChemComm, 2018, DOI: 10.1039/C8MD00166A

Piattaforma di High- throughput Screening

CONTACTS:
Chiara Cipollina, PhD
ccipollina@fondazionerimed.com

La piattaforma di high-throughput screening (HTS) si occupa dello sviluppo, validazione e miniaturizzazione di saggi biochimici e cellulari da utilizzare per lo screening di librerie di piccole molecole. La nostra strumentazione consente l'impostazione di protocolli flessibili, parzialmente automatizzati, utilizzando diversi readout tra cui assorbanza, luminescenza, fluorescenza, TR-FRET, imaging. Il laboratorio è dotato di un sistema per high-content screening (HCS) abbinato a strumenti software per l'analisi delle immagini e la valutazione dei dati. Al momento, la piattaforma lavora a supporto dei progetti di Drug Discovery occupandosi sia dello screening primario che dei saggi di validazione dose-risposta e della messa a punto di saggi secondari.



Competenze

- Set-up e validazione di saggi primari (biochimici e cellulari);
- Saggi basati su TR-FRET;
- Miniaturizzazione del saggio in piastre da 384 pozzetti;
- High-content imaging;
- Screening;
- Analisi dei dati e selezione degli hit primari;
- **Hit picking** per validazione di **primary hits** attraverso curve dose-risposta;
- Saggi ortogonali, secondari e saggi di tossicità.

Dotazione tecnologica

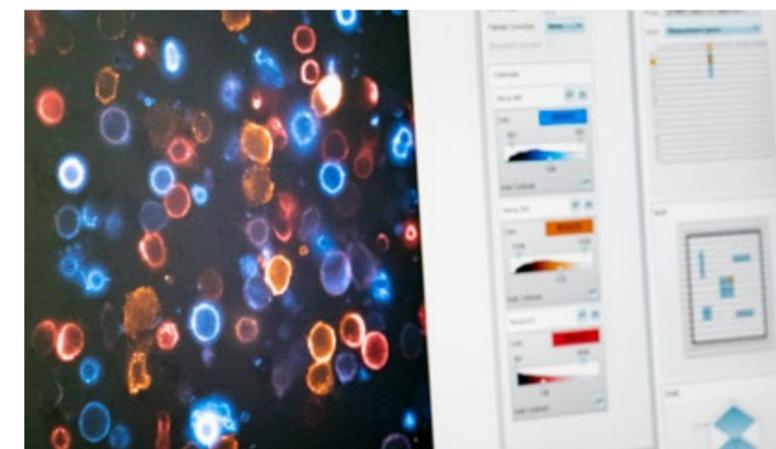
- Wet lab per biologia cellulare e molecolare;
- Operetta-CLS (Perkin Elmer) - Sistema per high-content screening (HCS);
- Spark (Tecan) - Multimode microplate reader;
- In-Hood-Bravo (Agilent) - Liquid handling system.

PROGETTI DI RICERCA ATTIVI

- **Sviluppo di inibitori della Istone Lisina Demetilasi 4 (Kdm4) per nuove terapie antitumorali:** il progetto ha come obiettivo la scoperta di nuove molecole in grado di inibire con efficacia e selettività l'enzima Kdm4. Nell'ambito di questo progetto utilizzeremo un saggio enzimatico primario per effettuare lo screening di librerie di piccole molecole opportunamente selezionate;
- **Sviluppo di inibitori selettivi del recettore intracellulare NLRP3 per il trattamento di patologie croniche associate all'invecchiamento:** il progetto ha come obiettivo la scoperta di nuove molecole in grado di inibire l'attivazione di NLRP3. Al momento stiamo lavorando con due approcci paralleli, uno volto ad inibire l'attività ATPasica di NLRP3 (puntando ad inibire il dominio NACHT) e uno volto ad inibire la formazione del complesso con ASC attraverso l'inibizione dell'interazione tra i domini PYD;
- **Scoperta di *small molecules* in grado di revertire il fenotipo $T_{exhausted}$ (T_{ex}) e di riattivare la risposta immunitaria nel contesto tumorale:** in collaborazione con IRIB-CNR stiamo lavorando per la messa a punto e validazione di un modello sperimentale di T_{ex} da utilizzare per la campagna di high-content screening.

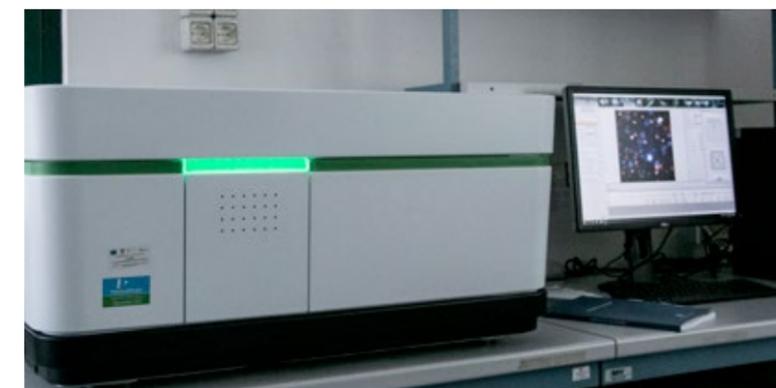
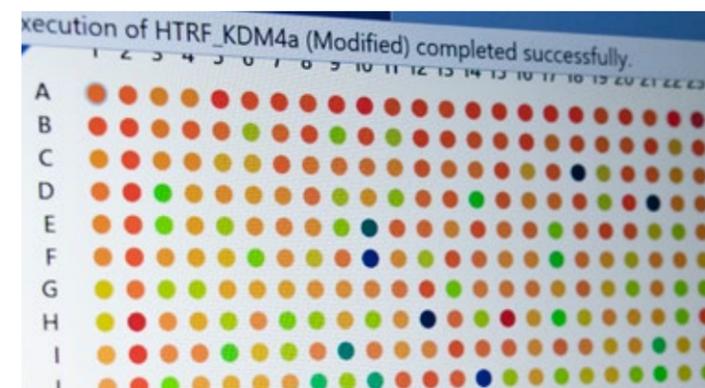
PUBBLICAZIONI

Mekni N, De Rosa M, Cipollina C, Gulotta MR, De Simone G, Lombino J, Padova A, Perricone U. "In Silico Insights towards the Identification of NLRP3 Druggable Hot Spots." Int J Mol Sci, 2019, 20(20). doi: 10.3390/ijms20204974.



COLLABORAZIONI:

- Istituto per la Ricerca e l'Innovazione Biomedica (IRIB) - CNR, Palermo, Italia;
- Institut de la Vision, Parigi, Francia
- Università degli Studi della Campania "Luigi Vanvitelli", Caserta, Italia
- Università degli Studi di Palermo, Palermo, Italia



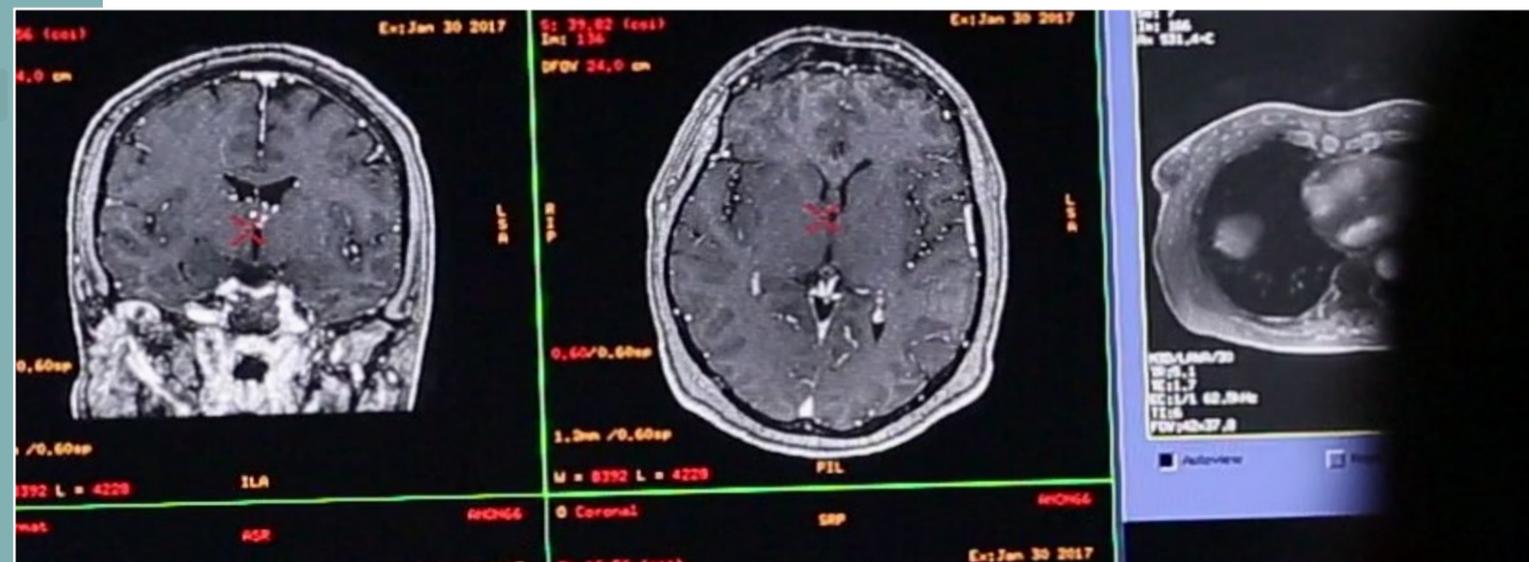
Piattaforma di Magnetic Resonance Imaging

CONTATTI:
Albert Comelli, PhD
acomelli@fondazionerimed.com

Durante il 2019 la piattaforma di Biomedical Imaging si è avvalsa di due risonanze magnetiche (3T e 7T), di altre metodiche di imaging messe a disposizione dagli enti collaboranti e di competenze per la segmentazione, l'estrazione e l'analisi di features statistico/radiomiche da immagini attraverso tecniche di machine learning per la diagnosi predittiva di patologie e recidive, e il supporto alle decisioni mediche. La piattaforma di Biomedical Imaging fornisce un importante supporto per facilitare la traduzione dei risultati scientifici in applicazioni cliniche, in particolare per la ricerca riguardante neuroscienze e cancro. Il gruppo, in prevista espansione, è adesso composto da un informatico esperto in analisi ed elaborazioni di immagini e dati biomedicali, e nell'acquisizione di immagini in risonanza magnetica clinica e preclinica, da un veterinario, un fisico e un dottorando in medicina nucleare. In particolare, la piattaforma si avvale di due MRI, a 3T e 7T, acquisiti attraverso il progetto ISpeMi, e localizzati rispettivamente presso l'IRCCS ISMETT e l'Istituto Zooprofilattico Sperimentale, e di PET/CT clinica e preclinica a disposizione dell'IBFM-CNR. Nel corso del 2020 la piattaforma verrà arricchita con strumenti basati su tecnologie alternative (Bioluminescenza), (PET/RM) e (CT) per offrire un più ampio spettro di analisi di immagini *in vivo*.

COLLABORAZIONI:

- IRCCS ISMETT, Palermo, Italia
- Istituto Zooprofilattico Sicilia (IZS), Palermo, Italia
- Istituto di bioimmagini e fisiologia molecolare, Consiglio Nazionale delle Ricerche (IBFM-CNR), Cefalù, Italia
- Georgia Institute of Technology, Atlanta, Stati Uniti
- Università di Palermo, Italia
- Unità di Fisica Medica, Ospedale Cannizzaro, Catania, Italia
- Dipartimento di Medicina Nucleare, Ospedale Cannizzaro, Catania, Italia
- Unità di Medicina Nucleare, Università di Messina, Italia



Competenze

- Magnetic Resonance Imaging (T1, T2, DP, DWI, ADC e DCE)
- Positron Emission Tomography/Computer Tomography (PET/CT)
- Spettroscopia su phantom, in-vivo e ex-vivo
- Modelli di Elaborazione delle Immagini (MR/PET/CT e istologiche), Segmentazione 3D, Deep Learning e Machine Learning per Estrarre, Classificare e Delineare i Volumi dei Tumori e le Caratteristiche di Radiomica per la Diagnosi Predittiva di Patologie e Recidive e di Supporto alle Decisioni Mediche
- Progettazione e Realizzazione di Phantom per Studi di Spettroscopia, Mezzi di Contrasto e Morfovolumetria

Dotazione tecnologica

Presso l'Istituto Zooprofilattico Sperimentale:

- Bruker Pharmascan 70/16 (7 Tesla). Bobine disponibili:
 - Mouse and rat brain 2x2 receive surface array coils
 - Mouse and rat transmit-receive volume coil (40 mm diametro interno e 75 mm diametro esterno)
 - Rat body 8x2 transmit volume array coil (72 mm diametro interno e 89 mm diametro esterno)
- Software: TopSpin, Paravision 6.1, Jmri, Tarquin, Horos

Presso IRCCS ISMETT:

GE DISCOVERY MR 750 W 3 Tesla Risonanza Magnetica ad alto campo 3.0 T (neuro, body, mammella, angio, osteoarticolare, cardio, etc.).

Presso l'Istituto di bioimmagini e fisiologia molecolare, Consiglio Nazionale delle Ricerche (IBFM-CNR):

- PET/CT Clinica e Preclinica

PROGETTI DI RICERCA ATTIVI

Imaging in vivo su piccoli animali a supporto del progetto Immunoterapia NK-mediata per il trattamento e/o la prevenzione della recidiva HCC e/o HCV post-trapianto della Dott.ssa Ester Badami.

PUBBLICAZIONI

D. Giambelluca, R. Cannella, F. Vernuccio, A. Comelli, A. Pavone, L. Salvaggio, M. Galia, M. Midiri, R. Lagalla and G. Salvaggio. PI-RADS 3 Lesions: Role of Prostate MRI Texture Analysis in the Identification of Prostate Cancer. *Current Problems in Diagnostic Radiology*. Accepted October 2019. DOI: 10.1067/j.cpradiol.2019.10.009

Alongi, P., A. Stefano, A. Comelli, S. Bignardi, M. Sabini, A. Yezzi, M. Ippolito, and G. Russo. A Machine Learning Segmentation Approach For The Extraction Of Radiomic Features In PET Studies. in *European Journal of Nuclear Medicine and Molecular Imaging*, vol. 46, no. suppl 1, pp. s764-s764. 233 spring st, new york, ny 10013 usa: springer, 2019.

A. Comelli, A. Stefano, S. Bignardi, C. Coronello, G. Russo, M.G. Sabini, M. Ippolito, and A. Yezzi. Tissue Classification to Support Local Active Delineation of Brain Tumors. In *Annual Conference on Medical Image Understanding and Analysis. MIUA 2019, CCIS 1065*,

pp. 3-14, 2020. DOI: 10.1007/978-3-030-39343-4_1
A. Comelli, and A. Stefano. A fully automatic system of Positron Emission Tomography Study segmentation. In *Annual Conference on Medical Image Understanding and Analysis. MIUA 2019, CCIS 1065*, pp. 353-363, 2020. DOI: 10.1007/978-3-030-39343-4_30



Piattaforma di Proteomica

CONTATTI:
Simone Dario Scilabra, PhD
sdscilabra@fondazionerimed.com

Ri.MED ha creato una piattaforma d'avanguardia per le analisi proteomiche, che comprende strumentazioni per metodologie biochimiche e di biologia molecolare, cappe sterili per la coltura di cellule e tessuti, e un sistema di cromatografia liquida ad alta prestazione (LCNano UltiMate 3000 RS) associato on-line ad uno spettrometro di massa (Q-exactive). In breve, questa strumentazione consente la separazione cromatografica dei singoli peptidi derivanti dalla digestione proteolitica di complessi sistemi proteici (ad esempio lisati cellulari, mezzi condizionati, tessuti o fluidi biologici), l'elettrospray per la ionizzazione di tali peptidi e la loro successiva frammentazione in ioni di diverso rapporto massa/carica, noto come spettro di massa, che è specifico per ciascun peptide. Gli spettri di massa vengono analizzati mediante software di proteomica, che permettono di risalire ad ogni singola proteina contenuta nel campione biologico di partenza. Inoltre, la tecnologia presente al Ri.MED consente analisi di proteomica quantitativa, mediante la quale è possibile non solo identificare le proteine presenti nel campione biologico, ma anche quantificare i livelli di espressione di una stessa proteina in diversi campioni biologici. L'obiettivo della nostra piattaforma è fornire analisi di proteomica quantitativa a supporto della ricerca scientifica non solo di Ri.MED, ma anche di gruppi di ricerca nazionali e internazionali. Così facendo, miriamo a diventare un punto di riferimento per l'intera ricerca scientifica nell'area.

COLLABORAZIONI:

- Institute for Aging and Chronic diseases, University of Liverpool, Regno Unito
- German Center for Neurodegenerative Diseases (DZNE), Monaco, Germania
- Queen Mary University of London, Regno Unito
- Dipartimento di Scienze Farmacologiche, Università di Pisa, Italia
- STEBICEF, Università di Palermo, Italia



Competenze

- Concentrazione di proteine da terreni condizionati
- Misura spettrofotometrica (Bradford, BCA, micro BCA)
- Precipitazione e analisi chimica del campione
- Digestione triptica in gel ed in soluzione
- Preparazione di peptidi con metodo FASP
- STAGE (STop And Go Extraction) Tip
- Sample CleanUp
- Frazionamento in base al pH
- Secretome protein enrichment with click sugars (SPECS)
- Proteomica quantitativa LFQ
- Western Blot
- SDS-PAGE

Dotazione tecnologica

- Cromatografia liquida ad altissime prestazioni, UHPLC UltiMate 3000 UHPLC Sistema RSLCnano (Thermo Scientific).
- Spettrometro di massa Q-Exactive (Thermo Scientific)

Software:

- Chromeleon
- Xcalibur
- Proteome Discoverer
- MAX QUANT
- Perseus per analisi statistiche

PROGETTI DI RICERCA ATTIVI

iRhom2: a new therapeutic target for osteoarthritis

L'osteoartrite (OA), conosciuta più semplicemente come artrosi, è una malattia degenerativa che causa dolore articolare e disabilità. A livello molecolare, l'artrosi è caratterizzata dalla degenerazione della cartilagine articolare, conseguenza dell'attività aberrante di due classi di enzimi, le metalloproteasi di matrice (MMPs) e le disintegrin metalloproteasi con domini trombospondina (ADAMTSs).

Il recettore endocitico LRP-1 controlla il turn-over di queste proteasi, e la sua inattivazione mediante "shedding" proteolitico ha effetti negativi sulla progressione della malattia. Sebbene l'artrosi non venga considerata come una malattia infiammatoria, la citochina pro-infiammatoria TNF svolge un ruolo cruciale nella progressione della patologia, in quanto induce l'espressione di metalloproteasi.

Sia TNF che LRP1 sono due proteine transmembrana che vengono rilasciate nello spazio extracellulare in seguito a taglio proteolitico mediato da ADAM17. È chiaro quindi come l'inibizione di ADAM17 possa avere effetti positivi sulla progressione dell'artrosi. Tuttavia, ADAM17 regola il rilascio di più di 80 proteine, e quindi una sua inibizione totale provoca effetti collaterali dovuti alla deregolazione dei livelli di tali queste proteine.

Due omologhi inattivi delle proteasi romboidi, conosciuti come iRhom1 e iRhom2, sono dei regolatori essenziali di ADAM17, in quanto ne mediano la maturazione attraverso il *pathway* secretorio, e indirizzano l'attività catalitica dell'enzima verso specifiche proteine transmembrana.

Grazie all'utilizzo di proteomica quantitativa, abbiamo scoperto che la maggior parte dei substrati di ADAM17 vengono rilasciati sia quando l'enzima è in complesso con iRhom1 che iRhom2. Al contrario, TNF e LRP-1 vengono tagliati da ADAM17 solo quando l'enzima è in complesso con iRhom2. Per questo motivo, l'inibizione farmacologica

di iRhom2 potrebbe dare effettivi positivi nella terapia dell'artrosi, con bassi rischi di effetti collaterali dal momento che l'attività di ADAM17 verso tutti gli altri substrati può essere supportata da iRhom1. Dimostrare quest'ipotesi è lo scopo principale di questo progetto.

iRhom2 regola i livelli di superficie delle molecole di classe del complesso maggiore d'istocompatibilità e le risposte immuni.

Le molecole di classe I del complesso maggiore d'istocompatibilità sono presenti in tutte le cellule nucleate e svolgono un ruolo fondamentale nell'espore gli antigeni peptidici per il loro riconoscimento da parte delle cellule del sistema immunitario innato.

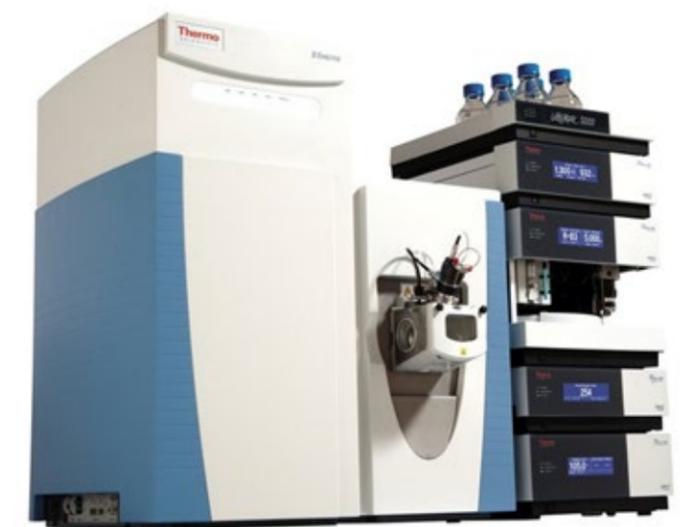
Grazie all'utilizzo della proteomica quantitativa abbiamo scoperto che i livelli di superficie delle molecole di classe I sono regolati da iRhom2. Lo studio del meccanismo molecolare con cui iRhom2 regola le molecole di classe I e le conseguenze funzionali *in vivo* di questo meccanismo di regolazione sono l'obiettivo principale di questo progetto.

PUBBLICAZIONI

Scilabra S.D., Pigoni M., Pravata V., Schatzl T., Muller S.A., Troeberg L., and Lichtenthaler S.F. (2018). Increased TIMP-3 expression alters the cellular secretome through dual inhibition of the metalloprotease ADAM10 and ligand-binding of the LRP-1 receptor. *Sci Rep* 8, 14697.

Yang C.Y., Troeberg L., Scilabra S. D., Quantitative mass spectrometry-based secretome analysis as a tool to investigate metalloprotease and TIMP activity. *Methods in Molecular Biology*, 2020, 2043:265-273

Carreca A.P., Pravata V.M., Murphy G., Nagase H., Troeberg L., Scilabra S.D. (2019) TIMP-3 facilitates binding of target metalloproteinases to the endocytic receptor LRP-1 and promotes scavenging of MMP-10 *bioRxiv* doi: <https://doi.org/10.1101/2019.12.23.886762>



Sistema Nano LC UltiMate 3000 utilizzato per la separazione dei peptidi, connesso con lo spettrometro di massa Q-Exactive per l'analisi LC-MS / MS.

Piattaforma CELL FACTORY

CONTATTI:
Chiara Di Bartolo, MSC
cdbartolo@fondazionerimed.com

Il Gruppo Cell Factory, che consiste di staff di Produzione, Assicurazione Qualità e Controllo Qualità, nonché di una persona qualificata per il rilascio di prodotti di Terapie Avanzate per uso clinico, mette a disposizione tramite la piattaforma le competenze necessarie per supportare la definizione di processi di produzione e test di controllo qualità conformi alla Good Manufacturing Practice (GMP). La nuova Cell Factory realizzata presso la struttura ospedaliera IRCCS ISMETT, in cui lavorano gli staff della Fondazione Ri.MED, permetterà di produrre terapie avanzate sviluppate dai ricercatori ISMETT e Fondazione Ri.MED, da utilizzare nell'ambito di sperimentazioni cliniche e per uso ospedaliero paziente-specifico.

Inoltre, grazie ad accordi specifici di Technology Transfer con l'Università di Pittsburgh o con altre Cell Factory/company in Italia ed Europa, sarà possibile produrre nella Cell Factory prodotti sviluppati esternamente per uso clinico in ISMETT o in altre strutture ospedaliere.

COLLABORAZIONI:
- IRCCS ISMETT, Palermo, Italia
- University of Pittsburgh, Pittsburgh, Stati Uniti
- UPMC, Pittsburgh, Stati Uniti



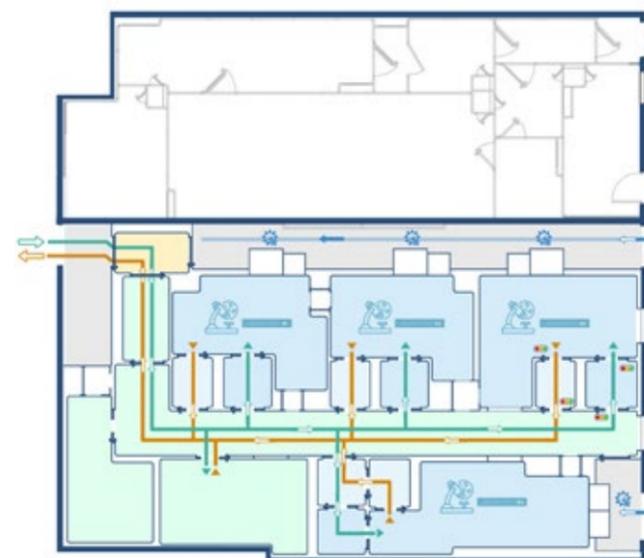
Competenze

- Allestimento Sistema di Assicurazione Qualità GMP compliant
- Creazione di protocolli di produzione
- Sviluppo di Metodi di Controllo Qualità
- Convalide ambienti, strumentazione, prodotti
- Formazione GMP

Descrizione degli ambienti

La nuova Cell Factory garantirà flessibilità nella tipologia di produzioni e funzionalità degli ambienti. Sulla base di specifiche User Requirement Specification sono stati sviluppati (ed approvati da AIFA durante un incontro di Scientific Advice) layout di aree di produzione e controllo per le tre tipologie di terapie avanzate (Terapia genica, Terapia cellulare somatica, Ingegneria dei Tessuti). Sono previsti 4 laboratori di classe B, di cui uno a maggior contenimento (con possibilità di essere messo in pressione negativa e con autoclave passante per il trattamento dei rifiuti). Gli altri 3 laboratori di classe B possono essere utilizzati in maniera totalmente indipendente, permettendo la preparazione simultanea di tre prodotti differenti, o possono essere resi comunicanti a due a due di modo che in un primo laboratorio vengano svolte parte delle operazioni (ad es. la pulizia di un organo) e nel secondo (passando l'intermedio di produzione tramite passbox) le altre (ad es. isolamento e coltura).

In una stanza in classe C verranno inseriti sistemi chiusi di preparazione cellulare. Vani tecnici su cui aggettano i motori della strumentazione permetteranno la manutenzione senza accedere nelle aree produttive. Ampi laboratori di Controllo Qualità sono attrezzati in modo da condurre tutti i test su materie prime, intermedi e prodotti finali necessari per il rilascio del prodotto, nonché ricevere e conservare adeguatamente reagenti, materiali e prodotti. Sia l'area produttiva, sia il laboratorio Controllo Qualità sono dotati di sistema di monitoraggio per il controllo in remoto dei parametri critici.



ATTIVITÀ

Lo Stato di avanzamento dei lavori della nuova Cell Factory e dei laboratori Controllo Qualità è al 90% di realizzazione al momento di stesura di questo report (Dic 2019)

E' stata predisposta documentazione fondamentale per l'autorizzazione della struttura ed è stato in parte ottimizzato il nuovo sistema di Assicurazione Qualità, consistente in procedure operative standard generali, di controllo qualità, di strumentazione, di produzione e metodi per le convalide.

E' proseguito lo sviluppo dei prodotti di immunoterapia adottiva di futura produzione.

Le attività principali per il 2020, una volta conclusa la realizzazione della nuova Cell Factory e dei laboratori Controllo Qualità, consistono nella validazione degli ambienti e di tutte le strumentazioni per rendere operative le nuove aree, nonché nel training e nella validazione di tutti gli operatori. Parallelamente, per quanto riguarda le produzioni legate al technology transfer e allo sviluppo di prodotti interni, verranno iniziate le convalide dei nuovi processi di produzione e dei correlati metodi di controllo qualità.

Esempi di attività legate all'attivazione della CF saranno: Installation, Operation and Performance Qualification di tutta la strumentazione, convalida del sistema HVAC (Heating, Ventilation and Air Conditioning), convalida del mantenimento delle classi ambientali, convalida della vestizione sterile (personale coinvolto in produzione, controllo qualità, sanitizzazione, manutenzione) training specifico e completo GMP di tutti gli operatori in base alla mansione, convalida della sanitizzazione e clean hold time, convalida del trasferimento materiali, convalida dei fornitori. Attività legate alle produzioni includeranno: Media Fill, convalide dei metodi CQ.

FINANZIAMENTI PER LA RICERCA

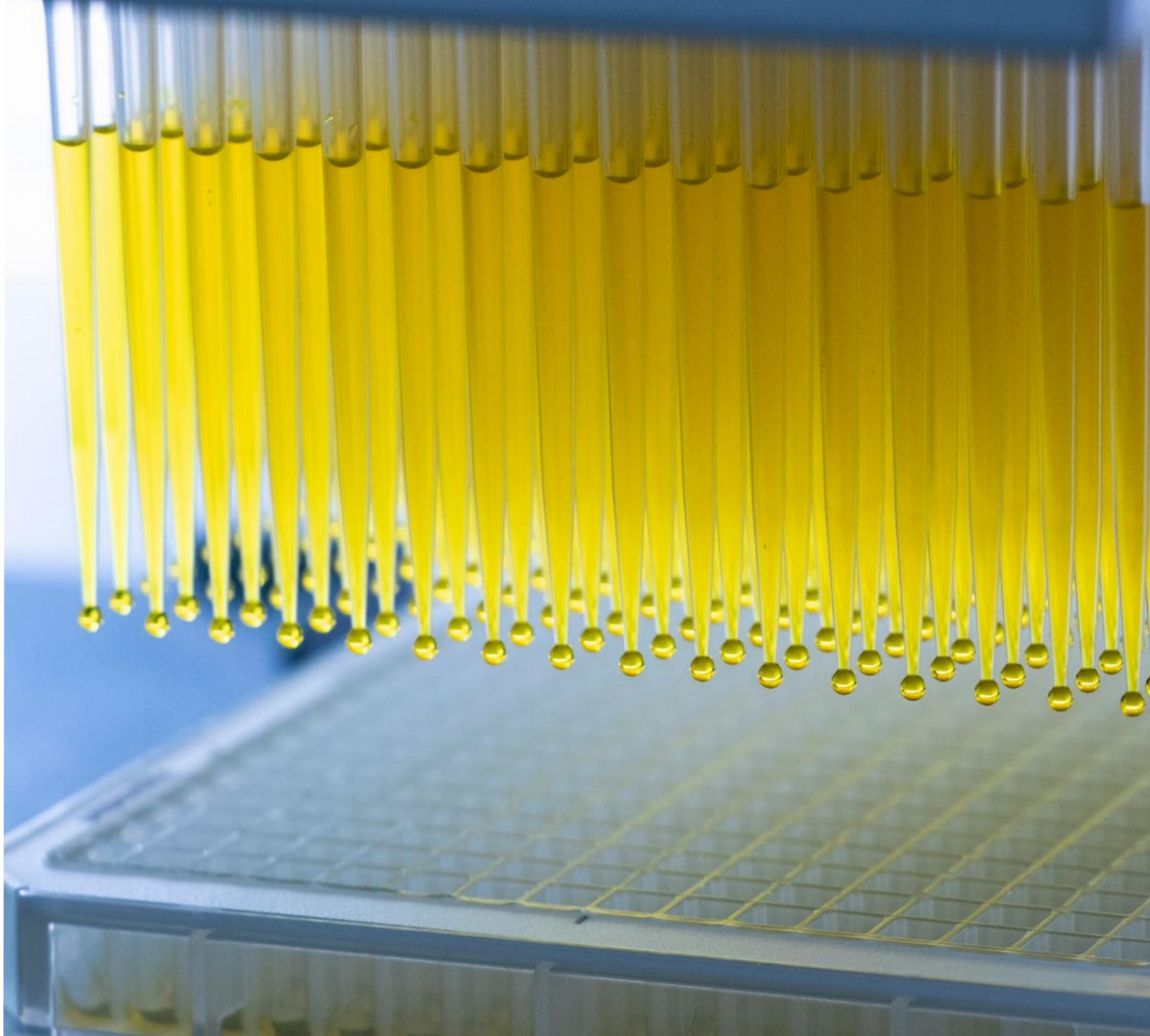
La Fondazione Ri.MED supporta la realizzazione della propria attività scientifica attraverso opportunità di finanziamento offerte da enti pubblici e privati, istituzioni regionali, nazionali e sovranazionali.

Il lavoro volto all'ottenimento dei finanziamenti per la ricerca rappresenta un'attività strategica per la Fondazione. Per questa ragione è stata costituita un'Area Grants, che si occupa di selezionare i programmi finanziari a sostegno della ricerca biomedica, della formazione specialistica e della cooperazione internazionale, di sottomettere le proposte - anche in collaborazione con altri enti - e gestire i rapporti con le amministrazioni titolari dei programmi di finanziamento, nonché di coordinare e supervisionare i progetti approvati.

Nel corso dell'anno 2019 sono proseguite le attività relative ai 6 progetti pluriennali finanziati nel 2017 e nel 2018 ed in corso di svolgimento. Su scorrimento di graduatoria hanno inoltre preso il via 3 nuovi Dottorati di ricerca innovativi a caratterizzazione industriale.

Il 2019 ha visto l'ammissione a finanziamento di 4 nuovi progetti di Ricerca&Sviluppo, a valere sul Programma Operativo Regione Siciliana 2013/2020. Si tratta di un risultato molto positivo, che premia l'impegno e la capacità dei nostri ricercatori. La Fondazione Ri.MED è stata inoltre scelta come host institution per un progetto di ricerca finalizzato a definire un nuovo target terapeutico per l'Osteoartrite attraverso l'uso di metodi all'avanguardia di proteomica e modelli in vivo, finanziato dalla Fondazione con il Sud.

Tra le attività del 2019 volte all'ottenimento di finanziamenti per la ricerca, va segnalata la sottomissione di 3 progetti a valere su bandi Horizon 2020 UE e 3 progetti di Ricerca&Sviluppo su finanziamenti nazionali (PON MIUR, PON MISE, Ricerca Finalizzata Ministero della Salute); un ricercatore Ri.MED ha inoltre applicato per una ERC Starting UE.



Progetti scientifici in corso di svolgimento nel 2019

CheMIST

Computational Molecular Design e Screening

Finanziato da: Assessorato alle Attività Produttive della Regione Siciliana nell'ambito del Patto per il Sud (Fondi CIPE)

L'obiettivo del progetto CheMIST è lo sviluppo di un laboratorio integrato e di un team di ricercatori con competenze interdisciplinari in grado di supportare la ricerca Ri.MED e di diventare un punto di riferimento per servizi di ricerca scientifica ad alto valore aggiunto a livello regionale, nazionale ed internazionale per enti di ricerca pubblici e aziende private. In particolare, il progetto prevede la messa in opera di 4 unità operative utilizzando la formula del lab hosting: 1) Biologia Strutturale e Biofisica; 2) Chimica Computazionale e Medicinale; 3) High Throughput Screening; 4) Bio-ingegneria.

The addition of simvastatin portal venous infusion to cold storage solution of explanted whole liver grafts for facing ischemia/reperfusion injury in an area with low rate of deceased donation

Finanziato da: Ministero della Salute nell'ambito del Programma di Ricerca Finalizzata 2013

L'obiettivo del progetto è testare l'eventuale efficacia clinica della somministrazione di Simvastatina per via intragastrica tre ore prima del cross-clamp del fegato intero dal donatore cadavere. Lo studio monocentrico, prospettico e randomizzato in doppio cieco, prevede l'arruolamento di 106 pazienti e il confronto con la procedura standard su campione trattato solo con placebo.

GMP Facility

Laboratori di Ricerca e Servizi Diagnostici e Terapeutici dell'Istituto Mediterraneo per i Trapianti e le Terapie ad Alta Specializzazione

Finanziato da: Assessorato alle Attività Produttive PO FERS Sicilia 2014-2020

Coerentemente con l'obiettivo previsto dall'Azione 1.5.1 "Sostegno alle Infrastrutture della ricerca considerate strategiche per i sistemi regionali al fine dell'attuazione della S3", il progetto è finalizzato a potenziare l'infrastruttura di ricerca dell'IRCCS ISMETT- Fondazione Ri.MED attraverso l'acquisizione di strumentazioni e nuove tecnologie per supportare le attività di ricerca e cliniche e accelerare la traslazione dei risultati ai pazienti.

OACTIVE

Advanced personalised, multi-scale computer models preventing OsteoArthritis

Finanziato da: Commissione Europea Horizon 2020 azione SC1-PM-17

L'obiettivo del progetto è elaborare modelli finalizzati ad una migliore diagnosi e cura dell'osteoartrite, adottando un approccio olistico, che prevede l'integrazione delle informazioni specifiche del paziente provenienti da vari livelli (cellule, tessuti, organi) con modelli comportamentali e fattori di rischio socio ambientali.

Infrastrutture di Ricerca - "GMP Facility, Laboratori di Ricerca e Servizi Diagnostici e Terapeutici dell'Istituto Mediterraneo per i Trapianti e le Terapie ad Alta Specializzazione".

Finanziato da: Assessorato alle Attività Produttive della Regione Siciliana

Il progetto prevede il potenziamento dei laboratori di ricerca, produzione cellulare e diagnostici del cluster Ri.MED-ISMETT attraverso l'acquisizione di attrezzature e strumenti all'avanguardia e attraverso lavori di ammodernamento dei laboratori.

4FRAILTY

Sensoristica intelligente, infrastrutture e modelli gestionali per la sicurezza di soggetti fragili

Finanziato da: Ministero dell'Istruzione, dell'Università e della Ricerca PON Ricerca e Innovazione 2014-2020

L'obiettivo è quello di realizzare uno strumento computazionale per simulare la piattaforma sensoriale nel suo insieme di sensori e quindi di parametri vitali ed ambientali che saranno raccolti nella fase di work-up clinico. La semplicità e versatilità dell'implementazione computazionale permetterà di simulare rapidamente differenti scenari virtuali delle possibili alterazioni dei segnali vitali ed ambientali associate ad una condizione patologica.

PIANO DELLE ATTIVITA' "TRASFERIMENTI PER METODOLOGIE INNOVATIVE NEL CAMPO DELLE BIOTECNOLOGIE 2018"

Finanziato da: Legge di stabilità Regione Siciliana Assessorato Salute Dipartimento DASOE

L'obiettivo è quello di sostenere le attività di ricerca del cluster Ri.MED-ISMETT nei settori della medicina rigenerativa, immunoterapia, bio-ingegneria e medicina di precisione.

Progetti scientifici ammessi a finanziamento nel 2019

PROGEMA

Processi green per l'estrazione di principi attivi e la depurazione di matrici di scarto e non

Finanziato da: Ministero dell'Istruzione, dell'Università e della Ricerca PON Ricerca e Innovazione 2014-2020

L'obiettivo è quello di attuare una innovazione di processo sulle acque di vegetazione della filiera olearia che consenta: l'estrazione e ricollocazione di composti organici farmacologicamente attivi, l'abbattimento del loro potere inquinante e il possibile riutilizzo nei processi produttivi dell'acqua trattata.

OBIND

Oncological therapies through Biological Interaction Network Discovery

Finanziato da: Regione Siciliana nell'ambito del bando PO FERS Azione 1.1.5

Il progetto è focalizzato allo studio e l'individuazione delle interazioni biologiche che influenzano le patologie tumorali, grazie all'utilizzo di nuovi approcci statistici e computazionali per il data processing e all'applicazione di modelli di analisi integrata di dati provenienti da differenti sorgenti.

SENSO

Sviluppo di un dispositivo miniaturizzato per il monitoraggio di stress ossidativo in sistemi cellulari

Finanziato da: Regione Siciliana nell'ambito del bando PO FERS Azione 1.1.5

Il progetto ha come obiettivo la realizzazione di un nano-sensore per la rivelazione di perossido di idrogeno (H₂O₂) rilasciato nel terreno di coltura in sistemi cellulari *in vitro/ex vivo*. Il progetto si propone di rendere disponibile un innovativo strumento da laboratorio, robusto, affidabile e di dimensioni ridotte che permetta di monitorare il rilascio di H₂O₂ nel terreno di coltura in tempo reale e senza perturbare le condizioni di crescita delle cellule.



Progetti scientifici sottomessi nel 2019

Prometeo

Prodotti medicinali derivati da placenta per terapie avanzate per patologie epatiche ed endometriali

Finanziato da: Regione Siciliana nell'ambito del bando PO FERS Azione 1.1.5

L'obiettivo principale del progetto è quello di sviluppare prodotti cellulari a base di cellule staminali isolate da placenta per applicazioni cliniche. Nello specifico, saranno sviluppate, attraverso studi *in vitro* e *in-vivo*, terapie cellulari per patologie epatiche acute e croniche e per la riattivazione dell'endometrio. Gli effetti terapeutici di cellule e derivati, saranno testati su modelli *in vivo* di danno epatico acuto e cronico e su modelli *in vitro* per la riattivazione endometriale. Tutto ciò sarà ottimizzato secondo protocolli basati sui principi delle *Good Manufacturing Practices* (GMP), allo scopo di sviluppare terapie cellulari.

Progetto iRhom2

"iRhom2a new therapeutic target in osteoarthritis"

Finanziato da: Fondazione con il Sud – Bando Capitale Umano ad Alta qualificazione 2018.

L'obiettivo del progetto è la validazione di iRhom2 come potenziale e innovativo *target* terapeutico per l'Osteoartrite attraverso l'uso di metodi all'avanguardia di proteomica e modelli *in vivo* della patologia. Il progetto prevede, inoltre, lo studio di inibitori di iRhom2.

Discovery of novel selective inhibitors of the NLRP3 inflammasome

Bando: UE Openscreen – European High-capacity screening network

Il progetto ha come obiettivo la scoperta di nuovi inibitori selettivi del recettore NLRP3 attraverso lo screening di una libreria di 100000 piccole molecole utilizzando un saggio primario precedentemente messo a punto nel laboratorio di high-throughput screening della Fondazione.

Ottimizzazione di approcci di tipo cell-based nel riparo delle ferite cutanee croniche

Bando: Fondo integrativo speciale per la ricerca (FISR)- Ministero della Istruzione, Ricerca e Innovazione (MIUR)

Il progetto ha lo scopo di affrontare alcuni punti critici derivanti dall'uso delle cellule staminali mesenchimali e dei loro prodotti nel wound healing e nella rigenerazione dei tessuti, quali: (I) fonte e variabilità del donatore in relazione ad applicazioni cliniche specifiche e alla medicina personalizzata; (II) comparazione fra cellule e prodotti cellulari di diversa origine; (III) soluzioni di rilascio di cellule e secreti in vista di due potenziali applicazioni cliniche: ferite croniche della cute e lesioni da trauma del midollo spinale.

Liver and cardiovascular damage in non-alcoholic fatty liver disease: a new non-invasive MR imaging approach

Bando: Ricerca finalizzata 2019, Ministero della Salute

Il progetto ha come obiettivo la creazione di un protocollo robusto non invasivo per la diagnosi della steatoepatite (NASH) e la stadiazione della fibrosi che ridurrà significativamente la necessità di biopsia nella malattia del fegato grasso non alcolica (NAFLD).

iRhomMunity - iRhom2: treating multiple diseases by hitting the major regulatory hub of immune responses

Bando: ERC- Starting Grant 2019

L'obiettivo del progetto è la generazione di farmaci che targhettino iRhom2, utilizzando diversi approcci che vanno dallo sviluppo di anticorpi specifici attraverso phage display al high throughput screening di piccole molecole.

Role of iRhom2 in the regulation of MHC class I molecules

Bando: American Department of Defence - Cancer Research Program

Lo scopo del progetto è lo studio dei meccanismi molecolari attraverso i quali iRhom2 controlla il complesso maggiore di istocompatibilità classe I, attraverso l'uso della proteomica. Inoltre ha l'obiettivo di studiare le conseguenze funzionali di questi meccanismi regolatori nel cancro.

Rete integrata per il potenziamento della ricerca clinica traslazionale per una medicina personalizzata per il cancro alla mammella

Bando: Piano Sanitario Nazionale 2019

Il progetto intende consolidare una rete di partner composta da Centri di Ricerca (Cnr, Infn, Ri.MED, Università) e Aziende Ospedaliere (Villa Sofia-Cervello ed AUOP Giaccone di Palermo) per potenziare la ricerca clinica e la diagnostica in ambito oncologico-senologico.

Placenta4Liver

Placenta Derived Stem Cells to treat Chronic Liver Disease

Bando: H2020-SC1-BHC-2018-2020- HORIZON 2020 – European Commission

NABUCCO

Nuovi Farmaci e Biomarkers di risposta e resistenza farmacologica nel cancro del colon retto

Bando: Accordo di Innovazione – Ministero dello Sviluppo Economico (MISE)

Il progetto mira alla creazione di un network diagnostico, prognostico e terapeutico, ottenuto dalla collaborazione tra *big pharma* (Merck Serono SpA), PMI (BIOVIX SRL), IRCCS e mondo accademico (Università "Vanvitelli", Ri.MED, IEO), per la deconvoluzione dei meccanismi patogenetici che sottendono l'eziogenesi del carcinoma del colon-retto.

Plat4BioReg

Biology centred bioink and bioprinting platform development for musculoskeletal repair and regeneration

Bando: H2020-NMBP-TR-IND-2018-2020- HORIZON 2020- European Commission

Il progetto ha lo scopo di sviluppare nuovi biomateriali basati su prodotti naturali e matrice extracellulare de-cellularizzata che, una volta combinati con opzioni cellulari innovative, possano riparare e sostituire cartilagini, legamenti e tendini danneggiati.

AMADEUS

A modular multi-orgAn-on-chip platforM for investigating the role of the crosstalk between gut, gut microbiota, white adipose tissue and osteochondral unit in the onset of osteoarthritis

Bando: H2020-NMBP-TR-IND-2018-2020- HORIZON 2020- European Commission

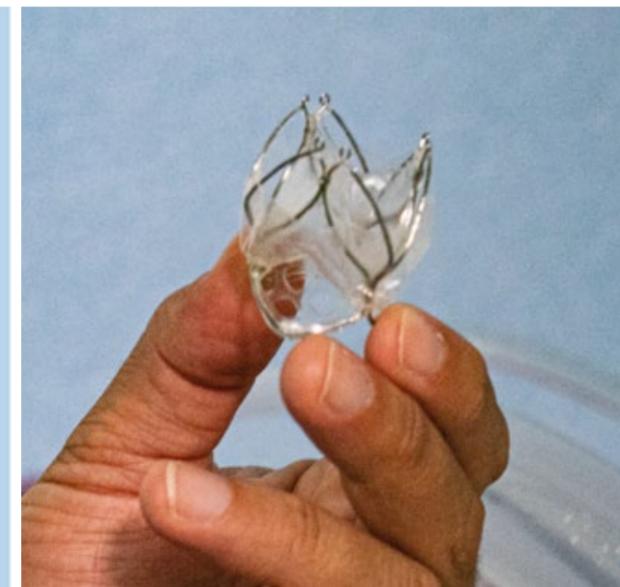
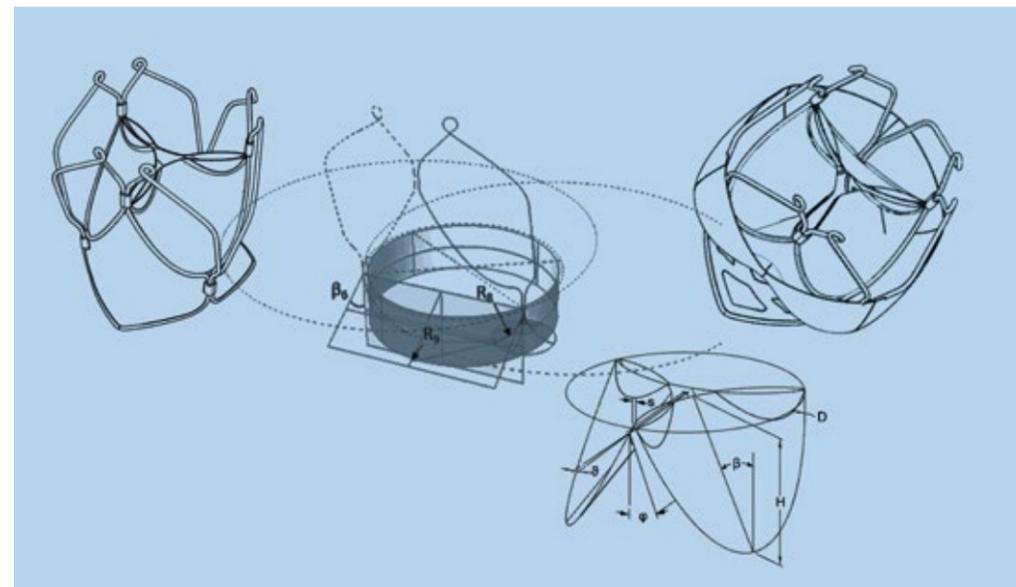
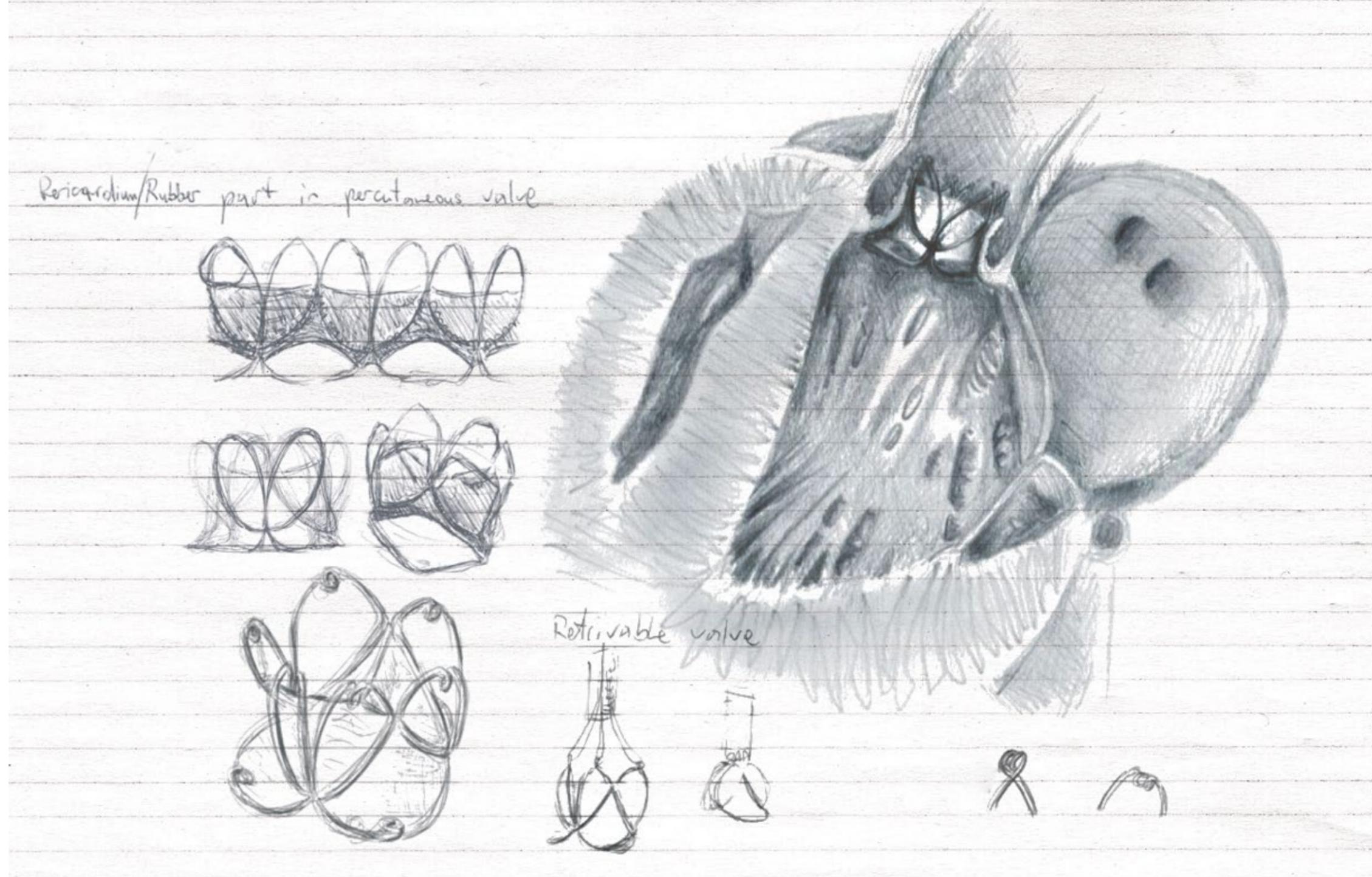
Il progetto intende realizzare un modello di organ-on-chip *in vitro* che include le articolazioni, il tessuto adiposo, il microbiota e l'intestino per lo screening di farmaci e la riduzione dei test su animali.

PROPRIETÀ INTELLETTUALE E TRASFERIMENTO TECNOLOGICO

L'attività di ricerca della Fondazione Ri.MED è fortemente orientata al paziente, ma per fare in modo che i risultati scientifici arrivino a colmare le necessità cliniche, bisogna gestire correttamente tanto la proprietà intellettuale generata dai nostri ricercatori, quanto il processo di trasferimento tecnologico che ne deriva. Dai laboratori, le invenzioni si traducono in brevetti e successivamente in nuove soluzioni per i pazienti.

La tutela della proprietà intellettuale rappresenta un valore fondamentale per la Fondazione Ri.MED, nell'ottica di sviluppare un modello innovativo di sostenibilità della ricerca. Per questa ragione Ri.MED si è dotata da alcuni anni di un'area "IP&TT" (Proprietà Intellettuale e Trasferimento Tecnologico) che lavora per supportare, promuovere e favorire l'avanzamento della ricerca traslazionale attraverso la valorizzazione delle sue ricadute applicative: brevettazione, licenza di brevetto, sponsorizzazione industriale e creazione di spin off tecnologiche.

Oltre al deposito delle nuove domande di brevetto ed alla gestione del portfolio esistente, nel corso del 2019 Ri.MED ha acquisito da UCL Business la piena titolarità del brevetto "Triskele", che vede tra gli inventori Gaetano Burriesci, Group Leader di Bioingegneria della Fondazione. Si tratta di un'invenzione di forte interesse, perché riguarda un dispositivo valvolare cardiaco impiantabile per via endovascolare altamente innovativo e già validato *in vitro*, che consentirebbe di acquisire visibilità e spessore in un'area di grande interesse clinico.





Portfolio Brevetti al 31.12.2019

SVILUPPO DI NUOVI FARMACI

Nitro-oleic acid controlled release platform to induce regional angiogenesis in abdominal wall repair.

WO2019100021

Fondazione Ri.MED - Università di Pittsburgh

Novel reversible nitroxide derivatives of nitroalkenes that mediate nitrosating and alkylating reactions

WO2018067709

Fondazione Ri.MED - Università di Pittsburgh

MEDICINA RIGENERATIVA E IMMUNOTERAPIA

NK-mediated immunotherapy and uses therefor

WO2018099988

Fondazione Ri.MED - IRCCS ISMETT

Mandrel-less electrospinning processing method and system, and uses therefor

WO2018175234

Fondazione Ri.MED - Università di Pittsburgh

Extracts for the regeneration of ligaments

PCT/US2019/019119

Fondazione Ri.MED - Università di Pittsburgh

INGEGNERIA DEI TESSUTI E DISPOSITIVI BIOMEDICALI

Method and system for the evaluation of the risk of aortic rupture or dissection in an ascending thoracic aortic aneurysm.

WO2018220573

Fondazione Ri.MED - IRCCS ISMETT

Transatrial access for intracardiac therapy

WO2017127682

Fondazione Ri.MED - Università di Pittsburgh

Bi-layer extra cellular matrix scaffolds and uses thereof

WO2017044787

Fondazione Ri.MED - Università di Pittsburgh

Double components mandrel for electrospun stentless, multi-leaflet valves fabrication.

WO2016138416

Fondazione Ri.MED - Università di Pittsburgh

Retrievable self-expanding non-thrombogenic lowprofile percutaneous atrioventricular valve prosthesis

WO2016138423

Fondazione Ri.MED - Università di Pittsburgh

Multi-layered graft for tissue engineering applications

WO2019023447

Fondazione Ri.MED - Università di Pittsburgh

Treating soft tissue via controlled drug release

WO2015134770

Fondazione Ri.MED - Università di Pittsburgh

Microfluidic Tissue Development Systems

WO2017062629

Fondazione Ri.MED - Università di Pittsburgh

A modular, microfluidic, mechanically active bioreactor for 3D, multi-tissue, tissue culture.

WO2015027186

Fondazione Ri.MED - Università di Pittsburgh

Recruitment of mesenchymal stem cells using controlled release systems

WO2014022685

Fondazione Ri.MED - Università di Pittsburgh

Osteoarthritis treatment with chemokine-loaded alginate microparticles

U.S. Patent Appl. No. 16/241,112

Fondazione Ri.MED - Università di Pittsburgh

Organ chip to model mammalian joint.

U.S. Patent Appl. No. 16/193,972)

Fondazione Ri.MED - Università di Pittsburgh

Multi-well mechanical stimulation systems and incubators

WO2019079722

Fondazione Ri.MED - Università di Pittsburgh

A stentless biopolymer heart valve replacement capable of living tissue regeneration.

WO2018156856

Fondazione Ri.MED - Università di Pittsburgh

An expandable percutaneous cannula

PCT/US2018/017795

Fondazione Ri.MED - Università di Pittsburgh

Biodegradable metallic - polymeric composite prosthesis for heart valve replacement

WO2019210059

Fondazione Ri.MED - Università di Pittsburgh - Università di Cincinnati

Processing method and apparatus for micro-structured rope-like material

US provisional Patent Application 62/874,114

Fondazione Ri.MED - Università di Pittsburgh

Valved stent for the treatment of tricuspid regurgitation

US provisional Patent Application 62/868,275

Fondazione Ri.MED - Università di Pittsburgh

Semi-rigid annuloplasty ring and method of manufacturing

WO2019220365

Fondazione Ri.MED

Heart valve prosthesis

WO2010112844

Fondazione Ri.MED



Ri.MED Research Retreat
Ottobre 2019, Teatro Garibaldi - Palermo

PROGETTO GRAFICO E CONTENUTI EDITORIALI
Ufficio Comunicazione & Marketing Fondazione Ri.MED
communication@fondazionerimed.com

Stampato da Officine Grafiche soc. coop., Palermo
Febbraio 2020



Via Bandiera, 11 - 90133 Palermo, Italy
Tel. +39 091 6041111 - info@fondazionerimed.com
www.fondazionerimed.eu