



**REPORT**  
Scientifico  
**2018**

# REPORT Scientifico 2018

IMMAGINE DI COPERTINA:

Immagine ottenuta mediante microscopia a scansione elettronica di una sezione trasversa di un vaso sanguigno ingegnerizzato.  
Il dettaglio mostra la parete a doppio strato e la diversa morfologia dello *scaffold* ottenuta mediante separazione di fase termo-indotta (*core* poroso) ed elettrofilatura (rivestimento esterno fibroso).  
Il polimero biodegradabile utilizzato è poliestere-uretano-urea.

— SOCI FONDATORI —



Regione Siciliana

— PARTNER —





**Alessandro Padova**  
DIRETTORE GENERALE

Il 2018 è stato un anno importante per Ri.MED, che ha raggiunto positivi traguardi sia in termini di risultati scientifici, che di formazione e divulgazione nel settore Life Science; grazie alla lungimiranza della Presidenza del Consiglio dei Ministri e della Regione Siciliana, quest'anno è stato ulteriormente potenziato il **Cluster Ri.MED-IRCCS ISMETT**, su cui si basa lo sviluppo del concept di **ricerca e medicina traslazionale**: dal paziente al laboratorio, con i risultati che tornano al paziente.

Durante il 2018, grazie all'interazione con il CNR ed al finanziamento **CheMIST** da parte della Regione Siciliana, Ri.MED ha implementato le piattaforme tecnologiche di *high content e high throughput screening* e potenziato quelle di biofisica e biologia strutturale, di chimica computazionale e di bioinformatica. Le attività di medicina rigenerativa e ingegneria biomedica si focalizzano sulle malattie terminali d'organo, grazie alle partnership strategiche con l'Università di Pittsburgh, UPMC e l'IRCCS-ISMETT.

Risultati tangibili sono gli oltre 20 brevetti, sviluppati secondo un modello di *networking* che ci permette di integrare competenze complementari, aumentare la massa critica dei risultati scientifici, nonché le potenzialità di accesso alle linee di finanziamento della ricerca.

Il 2018 ha segnato l'avvio della seconda e ultima fase della gara per la costruzione del **Centro per le Biotecnologie e la Ricerca Biomedica**: la posa della prima pietra diventa obiettivo concreto già a partire dal 2019, un ulteriore passo verso la realizzazione di un centro che si attesterà quale *hub* per la ricerca e la salute di tutto il Mediterraneo, anche grazie al progetto di una futura integrazione con l'ospedale ISMETT2.

Un ringraziamento a tutto il personale Ri.MED che, con **competenza, passione e spirito di squadra**, si dedica giorno dopo giorno allo sviluppo di terapie innovative per il paziente contribuendo ad una rinascita socio-economico in Sicilia e nel Mezzogiorno.

*Alessandro Padova*



**Dario Vignali**  
DIRETTORE SCIENTIFICO

Benvenuti alla nuova edizione dell'annuale Report Scientifico, che offre una panoramica sulla nostra attività, i ricercatori e le tecnologie disponibili, elementi chiave della missione di Ri.MED: tradurre la ricerca biomedica e biotecnologica in terapie innovative per i pazienti, impegnandosi al contempo per la selezione e la formazione della prossima generazione di scienziati e biomedici italiani.

Nel corso del 2018, grazie al grande lavoro svolto dal Comitato Scientifico (Prof. Francesco Dieli - nominato dal CNR- Prof. Ivet Bahar - nominato da UPMC - Prof. George Fadi Lakkis - nominato da UP - e Prof. Claudio Bordignon, nominato dal Consiglio di Amministrazione di Ri.MED), è stata condotta una revisione strategica della ricerca e del focus terapeutico di Ri.MED. D'ora in avanti, il focus di Ri.MED si concentrerà su tre principali aree terapeutiche: **cancro**, con particolare attenzione all'immunoterapia; **insufficienza d'organo**, che include trapianto di organi e medicina rigenerativa; **patologie legate all'invecchiamento**, con enfasi sulla neurodegenerazione.

Non a caso quindi, il tema scelto per l'edizione 2018 dell'annuale Simposio Scientifico di Ri.MED è stato **"Cancer Immunotherapy: Recent Progress and Future Challenges"**; l'evento, organizzato a Palermo, ha riunito una *panel* di esperti internazionali e riscosso un notevole successo di pubblico, confermando il ruolo che Ri.MED può e intende, sempre più, svolgere nella comunità scientifica internazionale e sul territorio.

In concomitanza con il Simposio, si è svolto anche il **1° Ri.MED Research Retreat**, nel corso del quale una ventina dei nostri ricercatori hanno presentato il loro lavoro: un momento corale di condivisione dei risultati e degli obiettivi della ricerca, oltre che un'occasione importante per esplorare possibilità di nuove collaborazioni scientifiche.

Il Comitato Scientifico ha anche esaminato il possibile ripristino del programma Ri.MED Post-Doc Fellowship. Nel corso del 2019 svilupperemo ulteriori piani di sviluppo strategico della ricerca, per costruire un percorso solido in previsione dell'apertura in Sicilia del Centro Ri.MED per le Biotecnologie e la Ricerca Biomedica.

L'impegno per l'eccellenza e per la crescita dei nostri ricercatori, l'ambiente internazionale e multidisciplinare e la ricca rete di collaborazioni presenti e in via di sviluppo sono i fattori che mi fanno sentire orgoglioso di essere parte di Ri.MED e del suo progetto.

*Dario Vignali*

# INDICE

## Ri.MED OVERVIEW 6

FORMAZIONE	8
DIFFUSIONE DEL SAPERE SCIENTIFICO	10
NETWORK	12
CBRB	14
PUBLIC ENGAGEMENT	16

## GRUPPI DI RICERCA Ri.MED 18

## Ri.MED SUPPORTED SCIENTISTS 22

## SVILUPPO DI NUOVI FARMACI 24

Meccanismi molecolari di patologie da misfolding proteico: funzione fisiologica versus aggregazione Caterina Alfano, PhD	26
Ruolo dei macrofagi nell'induzione delle sialyltransferasi nel cancro al colon Sandra Cascio, PhD	28
Ruolo dell'infiammasoma NLRP3 e alterazioni immuno-metaboliche nella broncopneumopatia cronica ostruttiva (BPCO) Chiara Cipollina, PhD	30
Sviluppo di algoritmi per modellizzare il network di interazione di microRNA e relativi target Claudia Coronello, PhD	32
Interazione NOX2/mitocondrio nella patogenesi della malattia di Parkinson Roberto Di Maio, PhD	34
Farmacocinetica degli elettrofili acidi grassi nitrati Marco Fazzari, PhD	36
Azioni protettive degli acidi grassi nitrati (NO <sub>2</sub> -FA) nella malattia di Parkinson Marco Fazzari, PhD	38
Farmacologia dei lipidi nitro-nitrati Marco Fazzari, PhD	40
Progettazione di modulatori della Istone lisina demetilasi 4 (KDM4) come agenti antitumorali Ugo Perricone, PhD	42

## MEDICINA RIGENERATIVA E IMMUNOTERAPIA 44

Immunoterapia NK-mediata per il trattamento e/o la prevenzione della recidiva HCC e/o HCV post-trapianto Ester Badami, PhD	46
Cellule Dendritiche regolatorie nella prevenzione del rigetto di organo Ester Badami, PhD	48
Produzione del secretoma di cellule mesenchimali stromali (MSCs) umane e potenziale uso clinico Cinzia Chinnici, PhD	50
Funzione delle globine ed effetto del nitrito nella rigenerazione cardiaca e durante lo sviluppo embrionale Paola Corti, PhD	52
Immunoterapia contro K. pneumoniae basata su ceppi probiotici S. cerevisiae geneticamente modificati Bruno Douradinha, PhD	54
Sviluppo di un vaccino contro l'HIV basato su ceppi di S. cerevisiae geneticamente modificati Bruno Douradinha, PhD	56
Sorveglianza e caratterizzazione di ceppi batterici multiresistenti di rilevanza clinica Bruno Douradinha, PhD	58
Rigenerazione di un fegato in sedi ectopiche Maria Giovanna Francipane, PhD	60
Rigenerazione di un rene in sedi ectopiche Maria Giovanna Francipane, PhD	62
Linfociti T multi-virus specifici per il trattamento delle infezioni virali post trapianto Monica Miele, PhD	64
Effetti della componente cellulare dell'ascite sul fenotipo delle cellule derivanti da placenta umana Mariangela Pampalone	66

## INGEGNERIA DEI TESSUTI E DISPOSITIVI BIOMEDICALI 68

Sviluppo di bio-adesivi per ambienti acquosi Caterina Alfano, PhD	70
Sviluppo di una valvola cardiaca transcateretere innovativa Gaetano Burriesci, PhD	72
Sviluppo di una valvola cardiaca in tessuto animale priva di Alfa-Gal Gaetano Burriesci, PhD	74
Analisi dell'appendice atriale sinistra per la predizione del rischio di trombosi Gaetano Burriesci, PhD	76
Predizione del potenziale di lesioni ischemiche a seguito di terapie cardio-valvolari Gaetano Burriesci, PhD	78
Simulazione in vitro di terapie della valvola mitrale Gaetano Burriesci, PhD	80
Bioreattori per l'elaborazione e deposizione di matrice extra-cellulare Antonio D'Amore, PhD	82
Modelli numerici per la meccanica e la crescita tissutale di tessuti nativi ed ingegnerizzati Antonio D'Amore, PhD	84
Analisi strutturale ed istopatologica per immagini di tessuti nativi ed ingegnerizzati Antonio D'Amore, PhD	86
Parete di miocardio ingegnerizzata Antonio D'Amore, PhD	88
Valvole cardiache ingegnerizzate Antonio D'Amore, PhD	91
Vasi sanguigni ingegnerizzati Antonio D'Amore, PhD	94
Modelli osteocondrali 3D per lo studio di patologie degenerative e terapie in microgravità Riccardo Gottardi, PhD	96
R-CaRe - Riabilitazione per la rigenerazione della cartilagine Riccardo Gottardi, PhD	98
Modellazione in-silico per la stratificazione del rischio clinico di patologie cardiovascolari Salvatore Pasta, PhD	100

## PIATTAFORME TECNOLOGICHE 102

Bioinformatica	104
Bioingegneria	106
Biologia strutturale e biofisica	108
Computer Aided Drug Design	110
Magnetic Resonance Imaging	112
Proteomica	114

## FINANZIAMENTI PER LA RICERCA 116

Progetti in corso di svolgimento	118
Progetti ammessi a finanziamento	119
Progetti sottomessi	120
PhD innovativi attivati	121
PhD innovativi sottomessi nel 2018	122

## PROPRIETÀ INTELLETTUALE E TRASFERIMENTO TECNOLOGICO 124

Portfolio brevetti al 31.12.2018	126
----------------------------------	-----

# Ri.MED OVERVIEW AL 31.12.2018



## Proprietà intellettuale



circa

**300**

Publicazioni scientifiche

**23**

Brevetti depositati

**2**

Proposte di brevetto

## Formazione e occupazione



**52** Dipendenti nel 2018

**58%**  
  
**42%**



**23**

Borse di studio

**18**

Borse di studio Post Doc presso Università di Pittsburgh



**13**

Borse per Dottorati di Ricerca

**16**

Tirocini

## Finanziamenti per la ricerca



**14.773.643€**

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

**47**

Accordi di collaborazione scientifica in essere nel 2018

**19**

Accordi di collaborazione scientifica stipulati nel 2018

## Diffusione del sapere scientifico



**35**

Eventi scientifici internazionali Ri.MED

**8** Eventi istituzionali

**16**

Partecipazioni ad eventi di settore o eventi sul territorio

## Il progetto CBRB



**28.000** mq  
di laboratori

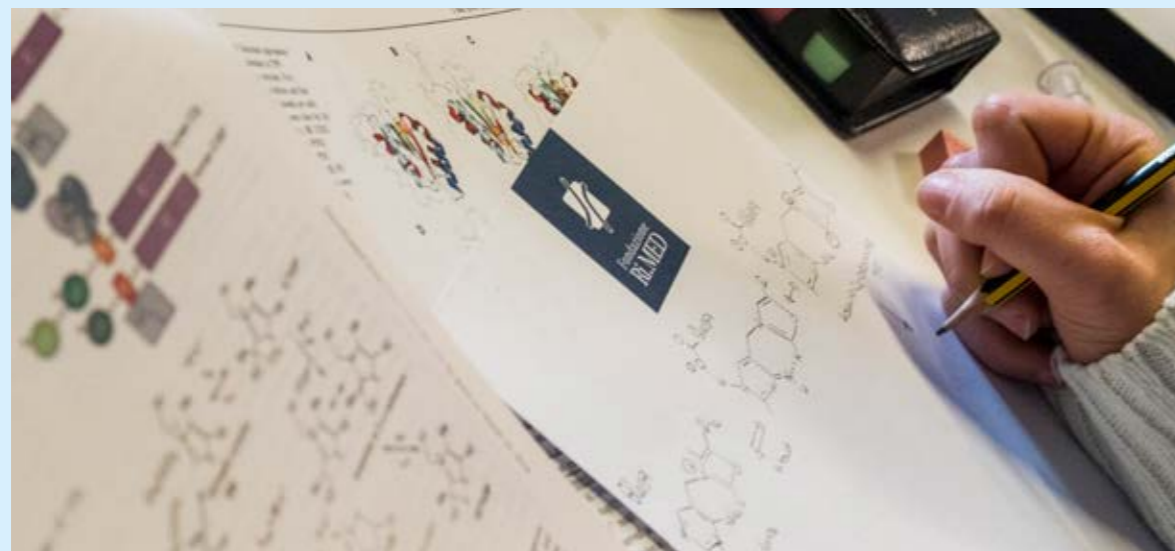
**196.350.000€**  
il valore dell'investimento



**600**  
Posti di lavoro previsti

# FORMAZIONE

La formazione di personale altamente qualificato non è solo una delle missioni statutarie di Ri.MED, ma anche un'attività che la Fondazione svolge con particolare entusiasmo, nella consapevolezza che l'offerta formativa di alto livello possa contribuire ad arricchire il futuro dei giovani, la competitività e lo sviluppo di tutto il territorio. Negli ultimi anni Ri.MED ha raggiunto importanti traguardi nella formazione di figure professionali con specifiche competenze nel campo delle biotecnologie, tra cui 41 borse di studio erogate, 16 tirocini svolti e 13 dottorati di ricerca.

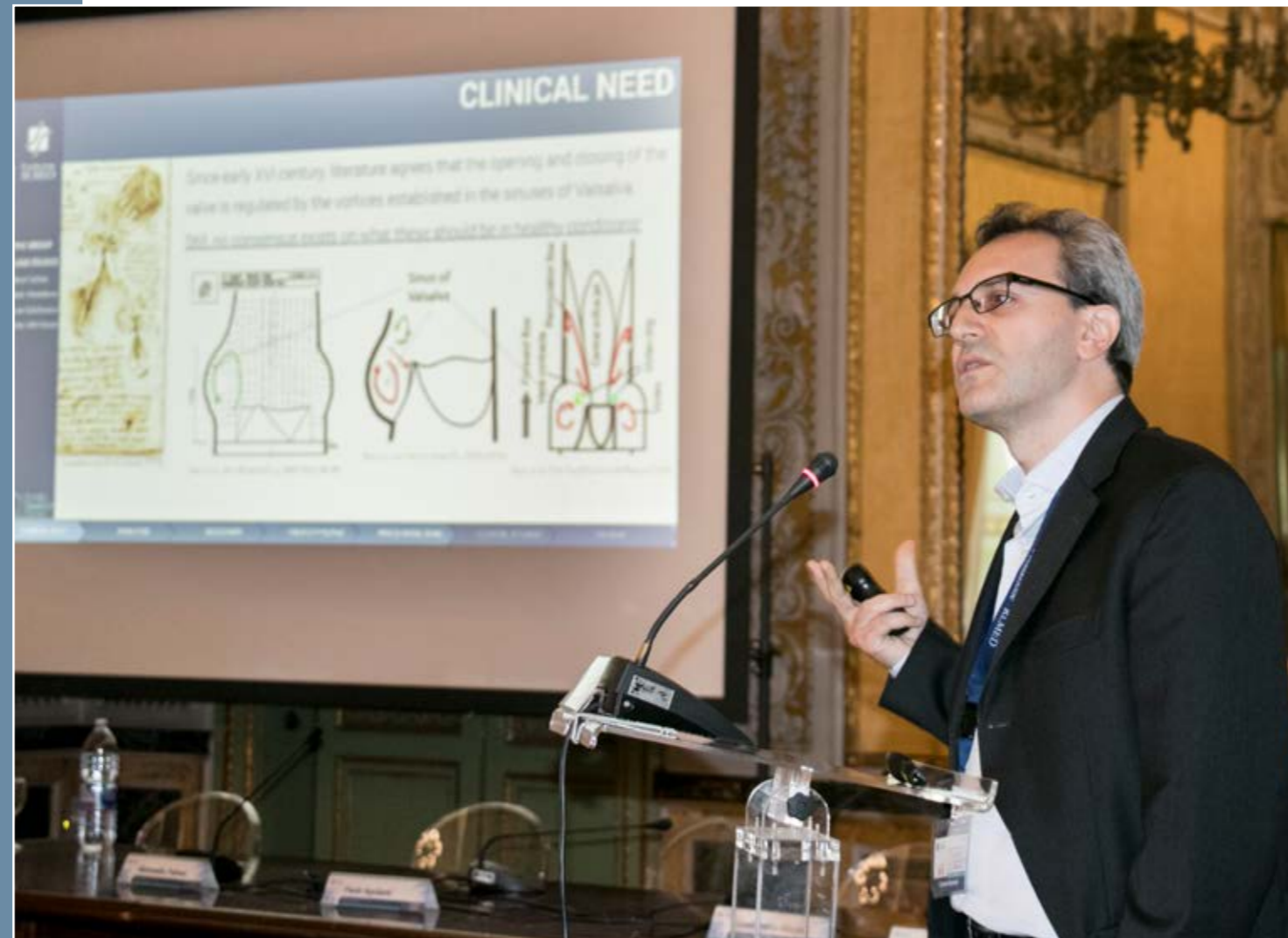


Dal 2007 al 2015 la Fondazione ha sponsorizzato 18 Post Doc Fellowship presso l'Università di Pittsburgh, e dal 2014 in poi ha attivato programmi di formazione nell'ambito di finanziamenti ottenuti su bandi europei, ministeriali e regionali: grazie al co-finanziamento di numerosi progetti, negli scorsi anni sono state formate decine di figure trasversali e altamente qualificate: bioingegneri, biologi, chimici computazionali e medicinali, manager scientifici, stabularisti, tecnici di laboratorio ed altri.

# DIFFUSIONE DEL SAPERE SCIENTIFICO

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

Oltre all'annuale Simposio Scientifico, Ri.MED organizza, anche in collaborazione con i propri partner scientifici, letture magistrali e workshop capaci di coinvolgere ricercatori provenienti da ogni parte del mondo.



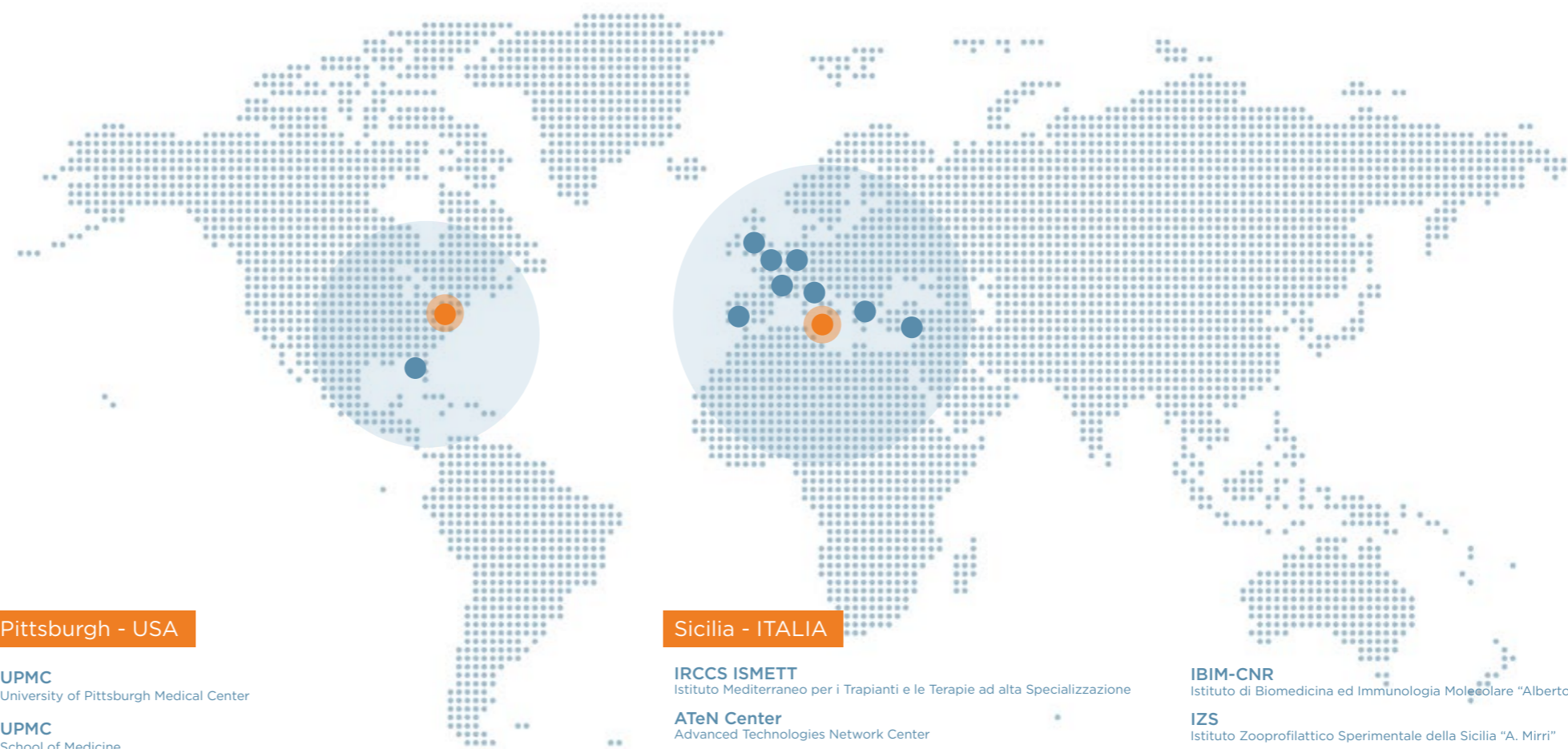
I nostri ricercatori hanno pubblicato ad oggi oltre 300 articoli scientifici su *peer review journal* con rilevante *impact factor*, contribuendo alla divulgazione scientifica di settore, oltre che alla generazione di proprietà intellettuale, mentre l'ufficio stampa opera per trasferire i principali tra questi risultati ad un pubblico più vasto di non addetti ai lavori.

# NETWORK

L'attività legata alla divulgazione scientifica trova spazio e forza nella sempre più ampia rete di collaborazioni e convenzioni scientifiche che Ri.MED sviluppa con enti ed istituzioni di settore: oggi sono operativi 33 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.

Ri.MED ha inoltre concordato la gestione diretta di laboratori situati all'interno di 3 enti con cui ha siglato accordi di collaborazione: è già operativa da anni la gestione dei laboratori di Medicina Rigenerativa e Tecnologie Biomediche presso l'IRCCS-ISMETT, di importanza strategica per l'integrazione della ricerca di base con quella clinica; più recenti gli accordi di gestione dei laboratori di Biologia Strutturale e Computazionale presso l'ATeN Center dell'Università di Palermo e i laboratori di IBIM CNR.

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.



## Pittsburgh - USA

**UPMC**  
University of Pittsburgh Medical Center

**UPMC**  
School of Medicine

**University of Pittsburgh:**  
Department of Surgery and Bioengineering,  
Department of Orthopaedic Surgery, University of Pittsburgh  
Department of Medicine, Division of Cardiology, University of Pittsburgh  
Department of Pathology, University of Pittsburgh  
Department of Pharmacology and Chemical Biology, University of Pittsburgh  
Department of Immunology, University of Pittsburgh

**McGowan Institute for Regenerative Medicine**

## Sicilia - ITALIA

**IRCCS ISMETT**  
Istituto Mediterraneo per i Trapianti e le Terapie ad alta Specializzazione

**ATeN Center**  
Advanced Technologies Network Center

**Fondazione Istituto Giglio di Cefalù**

**IAMC-CNR**  
Istituto per l'Ambiente Marino Costiero del Consiglio Nazionale delle Ricerche

**IBF- CNR**  
Istituto di Biofisica del Consiglio Nazionale delle Ricerche

**IBIM-CNR**  
Istituto di Biomedicina ed Immunologia Molecolare "Alberto Monroy" del CNR

**IZS**  
Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Sicilia "A. Mirri"

**Qwince LTD**

**Università degli Studi di Palermo**

**Università degli Studi di Messina**

**Università degli Studi di Catania**

## BELGIO

**Universiteit Antwerpen**  
**Université de Louvain**

## FRANCIA

**CNRS**  
Centre National de la Recherche Scientifique

**Sorbonne Université**

**UTC**  
Université de Technologie de Compiègne

**Institute de La Vision**

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

## GERMANIA

**Ludwig-Maximilians-Universität München**

**DZNE**  
Deutsches Zentrum für Neurodegenerative Erkrankungen

## GRECIA

**CERTH**  
Center for Research & Technology Hellas

**University of Patras**

## MALTA

**EDEX Educational Excellence Corporation Ltd**  
University of Nicosia

**CETRI**  
Center for Technology Research&Innovation

## SPAGNA

**LaFe**  
Hospital Universitari i Politècnic La Fe

## REGNO UNITO

**Liverpool John Moores University**

## ITALIA

**Aurora-TT**  
Translating Research into care

**Epi-C Epigenetic Compounds**

**UPMC**  
Institute for Health - Chianciano Terme

**Sterling SpA**

**TES PHARMA**  
Drug Discovery Innovation

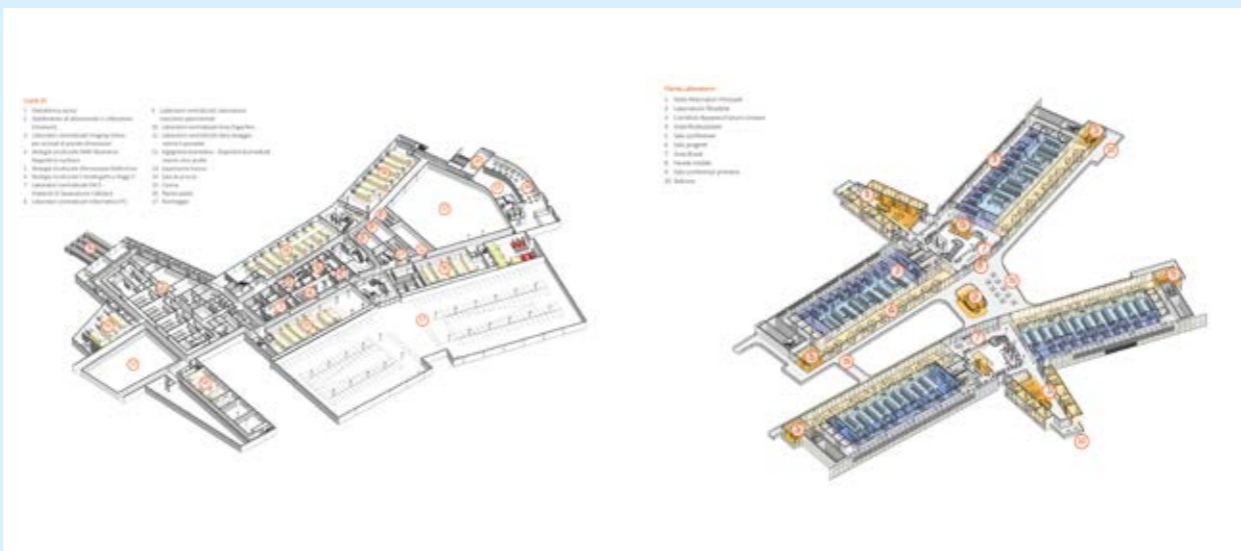
**Università degli Studi Roma Tre**



# CBRB

## CENTRO PER LE BIOTECNOLOGIE E LA RICERCA BIOMEDICA

Parallelamente all'attività di ricerca, Ri.MED è impegnata nella realizzazione in provincia di Palermo del Centro per le Biotecnologie e la Ricerca Biomedica (CBRB). Il raggruppamento di imprese vincitore del concorso di progettazione e con cui Ri.MED ha firmato il contratto per la progettazione definitiva ed esecutiva e il coordinamento della sicurezza, è capitanato da Hellmuth, Obata & Kassabaum Inc.. Nel settembre del 2018, al termine di 91 sedute di gara, è stata approvata la graduatoria relativa alla 1° fase della gara e in ottobre è iniziata la 2° fase, con l'invito degli operatori economici selezionati. La gara per l'affidamento dei lavori per la costruzione si concluderà nel corso del 2019.



Il CBRB, 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. 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 ispirare e intrattenere 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.



Le dimensioni ed il profilo del nascituro CBRB renderanno Ri.MED altamente visibile e in grado di svolgere un ruolo importante nel generare entusiasmo e interesse per la scienza, in particolare attraverso attività di sensibilizzazione con le scuole. Per raggiungere questi obiettivi, Ri.MED intende incrementare fin da ora la propria presenza sul territorio, sviluppando programmi educativi con le scuole e di coinvolgimento della comunità.



# Gruppi di Ricerca Ri.MED



## COMPUTER AIDED DRUG DESIGN

**Ugo Perricone, PhD**  
SENIOR SCIENTIST IN COMPUTER AIDED DRUG DESIGN  
[uperricone@fondazionerimed.com](mailto:uperricone@fondazionerimed.com)

Giada De Simone  
Scientist in Molecular Informatics - 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  
Medicine

Isabella Mendolia  
PhD Student in Engineering of Technological Innovation

Ri.MED Headquarter, Palermo

## BIONFORMATICS AND DATA ANALYSIS

**Claudia Coronello, PhD**  
SENIOR SCIENTIST IN COMPUTATIONAL BIOLOGY  
[ccoronello@fondazionerimed.com](mailto:ccoronello@fondazionerimed.com)

Giorgio Bertolazzi  
PhD Student in Statistical and Economic Sciences

Ri.MED Headquarter, Palermo

## IDENTIFICATION OF THERAPEUTIC TARGETS AND SCREENING

**Chiara Cipollina, PhD**  
PRINCIPAL INVESTIGATOR IN ANTI-INFLAMMATORY DRUGS  
[ccipollina@fondazionerimed.com](mailto:ccipollina@fondazionerimed.com)

Mario Fogazza, PhD  
Junior Scientist in High Throughput Screening - CheMIST

Francesco Patanè, PhD  
Junior Scientist in High Throughput Screening - CheMIST

Marco Buscetta, PhD  
Laboratory Technician - CheMIST

Ri.MED Lab c/o IBIM CNR, Palermo

## STRUCTURAL BIOLOGY AND BIOPHYSICS

**Caterina Alfano, PhD**  
GROUP LEADER IN STRUCTURAL BIOLOGY  
[calfano@fondazionerimed.com](mailto:calfano@fondazionerimed.com)

Maria Agnese Morando, 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

Anna Fricano  
PhD Student in Biotechnology and Molecular Medicine

Ri.MED Lab c/o ATen Center, Palermo



## REGENERATIVE MEDICINE AND IMMUNOTHERAPY

**Giovanna Frazziano, PhD**  
GROUP COORDINATOR  
[gfrazziano@fondazionerimed.com](mailto: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

**Anna Paola Carreca**  
Scientist in Proteomics

**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. Pains**  
Laboratory Technician

**Salvatrice Lo Giudice**  
Laboratory Support

Ri.MED Lab c/o IRCCS ISMETT, Palermo

## GPM CELL FACTORY

**Chiara Di Bartolo, MSc**  
QUALIFIED PERSON  
[cdibartolo@fondazionerimed.com](mailto:cdibartolo@fondazionerimed.com)

**Daniilo 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**  
HEAD OF ANIMAL WELFARE  
[vpagano@fondazionerimed.com](mailto: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

## COMPUTATIONAL AND EXPERIMENTAL BIOENGINEERING

**Gaetano Burriesci, PhD**  
GROUP LEADER IN BIOENGINEERING  
[gburriesci@fondazionerimed.com](mailto:gburriesci@fondazionerimed.com)

**Salvatore Pasta, PhD**  
Principal Investigator in Computational Bioengineering

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

**Marzio Di Giuseppe**  
PhD student in Technologies and Health Sciences

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

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

Ri.MED Lab c/o Università di Palermo



# Ri.MED Supported Scientist Pittsburgh



Courtesy of Giuseppe Peritore



**Sandra Cascio, PhD**  
RESEARCH ASSISTANT  
PROFESSOR,  
Department of Immunology,  
University of Pittsburgh  
[scascio@fondazionerimed.com](mailto:scascio@fondazionerimed.com)



**Paola Corti, PhD**  
RESEARCH ASSISTANT  
PROFESSOR,  
Department of Medicine,  
Division of Cardiology,  
University of Pittsburgh  
[pcorti@fondazionerimed.com](mailto:pcorti@fondazionerimed.com)



**Marco Fazzari, PhD**  
RESEARCH ASSISTANT  
PROFESSOR,  
Department of Pharmacology and  
Chemical Biology  
University of Pittsburgh  
[mfazzari@fondazionerimed.com](mailto:mfazzari@fondazionerimed.com)



**Maria Giovanna Francipane, PhD**  
RESEARCH ASSISTANT PROFESSOR,  
Department of Pathology  
University of Pittsburgh  
[mgfrancipane@fondazionerimed.com](mailto:mgfrancipane@fondazionerimed.com)



**Antonio D'Amore, PhD**  
RESEARCH ASSISTANT  
PROFESSOR,  
Department of Surgery  
and Bioengineering  
University of Pittsburgh  
[adamore@fondazionerimed.com](mailto:adamore@fondazionerimed.com)

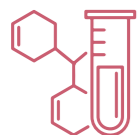


**Roberto Di Maio, PhD**  
RESEARCH ASSISTANT  
PROFESSOR  
Pittsburgh Institute for  
Neurodegenerative Disease  
[rdimaio@fondazionerimed.com](mailto:rdimaio@fondazionerimed.com)



**Riccardo Gottardi, PhD**  
RESEARCH ASSISTANT PROFESSOR  
Department of Orthopaedic Surgery  
University of Pittsburgh  
[rgottardi@fondazionerimed.com](mailto:rgottardi@fondazionerimed.com)

**Roberto Di Gesù, PhD**  
POST DOCTORAL RESEARCHER  
OACTIVE



## SVILUPPO DI NUOVI FARMACI

I ricercatori della Fondazione Ri.MED sono impegnati in progetti propri ed in collaborazione con centri di ricerca che mirano ad elucidare i meccanismi patofisiologici di malattie ad oggi senza rimedio.

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 neurodegenerative come per esempio la malattia di Parkinson, le malattie tumorali e patologie infiammatorie.

Alcuni di questi progetti sono oggi nella fase di ricerca e sviluppo preclinico di potenziali farmaci. 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* sviluppata durante il 2017, si è iniziato a selezionare, tramite tecniche *structure-based (docking)* e *ligand-based (pharmacophore)*, centinaia di molecole di origine sintetica e naturale. Le molecole selezionate vengono poi sintetizzate o acquisite per essere testate biologicamente e validate con *screening* ortogonali.

Nella fase successiva, le molecole biologicamente attive verranno ottimizzate tramite chimica medicinale per poi arrivare alla sperimentazione preclinica, allo studio dell'efficacia tramite studi *in vivo* integrati con *imaging* molecolare ed alla caratterizzazione del profilo farmacocinetico e tossicologico adatto per la sperimentazione clinica su pazienti. In parallelo sono in via di sviluppo metodi predittivi per monitorare l'efficacia dei potenziali farmaci e stratificare pazienti rispondenti alla terapia.



**Meccanismi molecolari di patologie da misfolding proteico: funzione fisiologica versus aggregazione**

Caterina Alfano, PhD

**Ruolo dei macrofagi nell'induzione delle sialyltransferasi nel cancro al colon**

Sandra Cascio, PhD

**Ruolo dell'inflammasoma 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

**Interazione NOX2/mitocondrio nella patogenesi della malattia di Parkinson**

Roberto Di Maio, PhD

**Farmacocinetica degli elettrofilici acidi grassi nitrati (NO<sub>2</sub>-FA)**

Marco Fazzari, PhD

**Azioni protettive degli acidi grassi nitrati (NO<sub>2</sub>-FA) nella malattia di Parkinson**

Marco Fazzari, PhD

**Farmacologia dei lipidi nitro-nitrati**

Marco Fazzari, PhD

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

Ugo Perricone, PhD

# Meccanismi molecolari di patologie da misfolding proteico: funzione fisiologica versus aggregazione

Caterina Alfano, PhD  
calfano@fondazionerimed.com

## COLLABORAZIONI

Department of Basic and Clinical Neuroscience - King's College London, Londra, Regno Unito  
Dipartimento di Fisica e Chimica - Università degli Studi di Palermo, Palermo, Italia

## AREA TERAPEUTICA

Patologie dell'invecchiamento

## PIPELINE



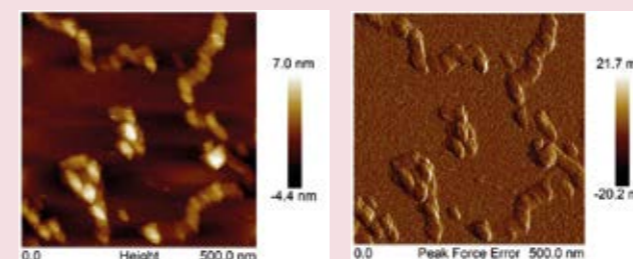
## BREVE DESCRIZIONE

Le malattie neurodegenerative sono una crescente minaccia della nostra società moderna che invecchia sempre più. Gli attuali trattamenti sono nel migliore dei casi palliativi e non specifici, riflettendo il fatto che la comprensione dettagliata delle basi molecolari della maggior parte di queste malattie è ancora carente. Noi miriamo a comprendere tali meccanismi molecolari e ci basiamo sul concetto che la conoscenza della funzione fisiologica e della rete di interazione delle proteine aggregogeniche sia uno strumento chiave per progettare molecole che possono competere specificamente con l'aggregazione patologica. Le interazioni proteina-proteina nativa potrebbero infatti fornire importanti mezzi per alterare e controllare la funzione

e l'assemblaggio di quelle proteine coinvolte nelle malattie neurodegenerative e potrebbero svolgere un ruolo protettivo contro l'aggregazione aberrante. I dati preliminari forniscono un forte sostegno a questa ipotesi e incoraggiano ulteriori studi su questa linea, aprendo nuove possibilità per affrontare lo sviluppo di molecole terapeutiche per tali malattie. Noi abbiamo scelto come sistema modello la proteina atassina-3, la proteina responsabile della malattia ereditaria Machado-Joseph (MJD) o atassia spinocerebellare di tipo 3. In caso di successo, le conoscenze acquisite su atassina-3 saranno molto utili per comprendere in generale gli eventi che portano a patologie dovute a *misfolding* di proteine e fornirebbero nuovi strumenti per prevenirle.

## IMPATTO

Il progetto di ricerca affronta questioni chiave, ed ancora senza risposta, nell'ambito della biologia strutturale e cellulare e che sono essenziali per ottenere nuove conoscenze per la comprensione delle malattie neurodegenerative. Le conoscenze di base fornite possono aiutare ad affrontare la progettazione di terapie specifiche finora assenti. Inoltre, la formazione di aggregati amiloidi non è solo legata alle malattie neurodegenerative ma, forse ancora più importante, può contenere indizi sul fenomeno fondamentale del ripiegamento e assemblaggio delle proteine aprendo così la possibilità di utilizzare le fibrille amiloidi come potenziali candidati per lo sviluppo di nuovi biomateriali. Il presente progetto, pertanto, potrebbe contribuire a migliorare l'eccellenza della ricerca non solo nella medicina, ma anche nel campo dei biomateriali aggiungendo anche un vantaggio socio-economico.



Aggregati di atassina-3 rilevati mediante microscopia a forza atomica ad alta risoluzione.

## RISULTATI RAGGIUNTI NEL 2018

Nel corso di quest'anno ci siamo concentrati sull'analisi dei processi di aggregazione di atassina-3 *wild-type* (con ripetizioni di 18 Gln) e di atassina-3 patologica (con 50 ripetizioni di Gln) e su come questi processi sono influenzati dalla presenza di catene di poli ubiquitina (polyUb), partner di legame naturale di atassina-3. A tale scopo, abbiamo usato: I) tecniche spettroscopiche, come la spettroscopia di assorbimento e fluorescenza, per studiare le variazioni conformazionali di entrambe le proteine; II) Dicroismo circolare per determinare la struttura secondaria e le sue possibili variazioni; III) diffusione della luce per l'analisi della crescita degli aggregati. Queste analisi hanno confermato che la forma patologica di atassina-3 ha una maggiore propensione a formare aggregati e la sua struttura secondaria cambia più drammaticamente rispetto alla forma *wild-type*. I nostri risultati hanno anche confermato che la formazione di aggregati di atassina-3 è fortemente inibita dalla presenza di catene polyUb. Inoltre, abbiamo lavorato alla creazione di linee cellulari inducibili stabili in grado di esprimere alti livelli delle due forme di atassina-3 in condizioni controllate. Queste linee cellulari ci permetteranno di avere un sistema *in-cell* adatto per studiare l'aggregazione e testare potenziali molecole terapeutiche, che potrebbero modificare il processo di aggregazione di atassina-3.

## OBIETTIVI PER IL 2019

Avviare un approccio di *drug design* su atassina-3 al fine di identificare molecole che imitando gli interattori naturali della stessa atassina-3 sono in grado di agire come modulatori della malattia. Le proprietà di interazione tra queste molecole ed atassina-3 e il loro effetto come modulatori dell'aggregazione saranno esaminate *in vitro* usando tecniche biofisiche. Le molecole che risulteranno positive negli studi *in vitro* saranno quindi testate in cellula utilizzando le linee cellulari inducibili stabili create *ad hoc* per questo scopo.

## CONFERENZE

UK-Israel Synergy Symposium - Protein misfolding in ageing and neurodegeneration: from basic biology to drug development, Marzo, 2018, Londra, Regno Unito.

## PUBBLICAZIONI

Martínez-Lumbreras S, Alfano C, Evans NJ, Collins KM, Flanagan KA, Atkinson RA, Krysztofinska EM, Vydyanath A, Jackter J, Fixon-Owoo S, Camp AH, Isaacson RL. (2018) Structural and Functional Insights into Bacillus subtilis Sigma Factor Inhibitor, CsfB. *Structure*, 26(4):640-648. doi: 10.1016/j.str.2018.02.007.

Pecci A, Ragab I, Bozzi V, De Rocco D, Barozzi S, Giangregorio T, Ali H, Melazzini F, Sallam M, Alfano C, Pastore A, Balduini CL, Savoia A. (2018) Thrombopoietin mutation in congenital amegakaryocytic thrombocytopenia treatable with romiplostim. *EMBO Mol Med*. 10(1):63-75. doi: 10.15252/emmm.201708168.

PRODOTTI: BIOMARCATORI

# Ruolo dei macrofagi nell'induzione delle sialyltransferasi nel cancro al colon

Sandra Cascio, PhD  
scascio@fondazionerimed.com



## COLLABORAZIONI

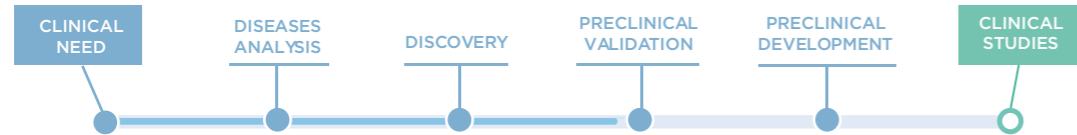
Department of Immunology, University of Pittsburgh School of Medicine, Pittsburgh, U.S.A.  
Department of Gastroenterology, University of Pittsburgh School of Medicine, Pittsburgh, U.S.A.  
Department of Engineering, University of Pittsburgh, Pittsburgh, U.S.A.



## AREA TERAPEUTICA

Cancro

## PIPELINE



## BREVE DESCRIZIONE

I macrofagi costituiscono una popolazione eterogenea che si differenzia in diversi sottotipi che sono schematicamente categorizzati in M1 e M2. I macrofagi M1 producono alti livelli di citochine pro-infiammatorie ed hanno una attività tumoricida, mentre i macrofagi M2 producono citochine anti-infiammatorie e sono coinvolti nel rimodellamento del tessuto e nella progressione tumorale. I macrofagi associati ai tumori, conosciuti come TAMs, presentano un fenotipo condiviso sia dalla popolazione M1 che M2, che dipende dal bilancio dei fattori pro-ed anti-infiammatori rilasciati dal microambiente circostante. In questo progetto, studiamo la funzione dei macrofagi che infiltrano il tessuto in siti di infiammazione. In particolare, testiamo

la loro abilità ad indurre l'espressione dei glico-antigeni sulle cellule epiteliali infiammate e tumorali. I glico-antigeni tumorali, fra cui alcune glicofornie di MUC1, attivano segnali intracellulari infiammatori ed oncogenici che a loro volta promuovono la perpetuazione dell'infiammazione cronica. Al momento, stiamo verificando l'ipotesi che i macrofagi, secernendo fattori infiammatori, promuovono l'espressione genica di glicosiltransferasi causando quindi una iper-espressione dei glico-antigeni tumorali di MUC1. Le cellule epiteliali sane esprimono bassi livelli della forma iperglicosilata di MUC1 mentre le cellule tumorali esprimono alti livelli di forme ipoglicosilate di MUC1 fra cui T, Tn, e le loro rispettive forme sialilate sT ed sTn.

## IMPATTO

Il micro-ambiente tumorale gioca un ruolo fondamentale nella progressione dei tumori. I macrofagi rappresentano la popolazione più abbondante dei tessuti infiammati e tumorali del colon. Una caratteristica fondamentale dei macrofagi è la loro plasticità ed abilità di cambiare facilmente il loro fenotipo e funzione in risposta ai segnali dell'ambiente circostante. Bisogna ancora chiarire il ruolo specifico dei macrofagi nello sviluppo della patogenesi dell'infiammazione cronica e progressione del cancro al colon. Il nostro gruppo ha scoperto che i macrofagi secernono citochine infiammatorie, fra cui IL-6 e TNF, che inducono forme alterate di MUC1 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 di specifiche forme alterate di MUC1, come per esempio MUC1-sT, MUC1-sTn, così come le glicosiltransferasi che le producono ST3GAL1 e ST6GALNAC1, ci permetterà di selezionare nuovi targets importanti per la prevenzione e trattamento del cancro al colon.



## RISULTATI RAGGIUNTI NEL 2018

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 *in vivo* suggeriscono che i tessuti infiammati di colon presentano un elevato numero di macrofagi. Per verificare che i macrofagi siano direttamente coinvolti nel controllo di forme alterate di MUC1, abbiamo utilizzato modelli di co-cultura. Brevemente, monociti umani sono stati differenziati nei sottotipi in M1 o M2 e poi messi in co-cultura con cellule epiteliali tumorali per tre giorni. Abbiamo trovato che i macrofagi M1 and M2 inducono l'iper-espressione della forma tumorale di MUC1. In aggiunta, lo studio dell'espressione genica di 84 geni associati alla glicosilazione, ha rivelato che i macrofagi M2 modulano l'espressione delle glicosiltransferasi, fra cui

ST6GalNAC1 e ST3GAL1, che sono appunto coinvolti nella biosintesi dei glico-antigeni tumorali. Usando modelli di studio *in vitro* ed *in vivo*, abbiamo identificato nuovi meccanismi molecolari con cui i macrofagi modulano l'espressione di ST6GALNAC1 ST3GAL1 e di conseguenza della forma MUC1-sTn e MUC1-sT.



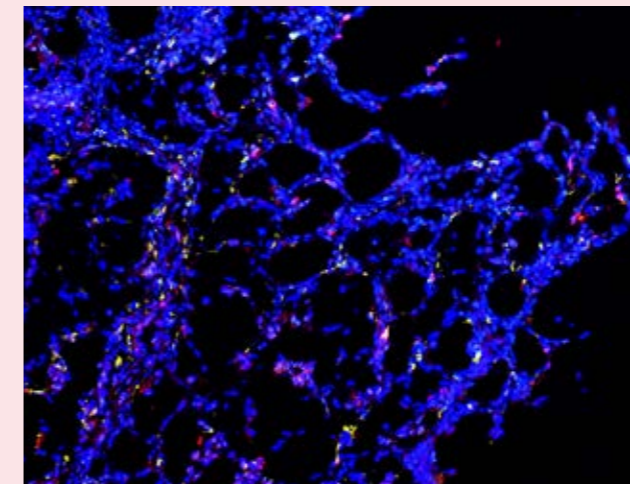
## OBIETTIVI PER IL 2019

Il nostro obiettivo è determinare il network che si stabilisce fra i macrofagi e i glico-antigeni tumorali di MUC1 nelle malattie croniche dell'intestino e nel tumore al colon. Ci proponiamo quindi di determinare un nuovo modello di comunicazione fra le cellule infiammate e/o tumorali ed il microambiente circostante. Al tal fine, valuteremo il ruolo delle forme alterate di MUC1 nella modulazione della polarizzazione e funzione dei macrofagi. I nostri risultati hanno rivelato che uno degli antigeni tumorali di MUC1 comunemente espresso nei tessuti infiammati e tumorali di colon è il MUC1-sTn. ST6GalNAC1 è l'enzima che aggiungendo acido dialico sui residui GalNAc degli O-glicani, forma questo antigene. Valuteremo se l'assenza del gene murino St6galNAC1 inibirà la formazione della struttura MUC1-sTn e conseguentemente la sua potenziale interazione con i macrofagi infiltranti il tessuto. Ci aspettiamo che prevenendo questa interazione intercellulare inibiremo la formazione dei macrofagi con un fenotipo pro-tumorale e quindi riusciremo ad inibire la progressione tumorale.



## CONFERENZE

American Association of Immunologists (AAI), Maggio, 2018, Austin (TX), USA.  
4th Annual Immuno-Oncology Young Investigator Forum, Aprile, 2018, Houston (TX), USA.



**iNOS, CD206, F4/80**  
Infiltrazione dei macrofagi associati al tumore (TAMs) nel tessuto di colon di topi MUC1. Tg dopo il trattamento con AOM e DSS.  
Immunofluorescenza Confocale. La colorazione è stata effettuata utilizzando l'anticorpo specifico per F4/80, un marker noto dei TAMs. Gli anticorpi anti-CD206 ed anti-iNOS sono serviti per identificare le sottopopolazioni dei macrofagi M1 and M2.



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

Chiara Cipollina, PhD  
ccipollina @fondazionerimed.com

## COLLABORAZIONI

- Istituto di Biomedicina ed Immunologia Molecolare "Alberto Monroy (IBIM) - CNR, Palermo, Italia
- Istituto Mediterraneo per i Trapianti (IRCCS - ISMETT), Palermo, Italia
- Institut de la Vision, Parigi, Francia
- Ospedale Civico Di Cristina Benfratelli, Palermo, Italia
- Università degli Studi di Palermo, Palermo, Italia

## AREA TERAPEUTICA

Patologie dell'invecchiamento



## BREVE DESCRIZIONE

La broncopneumopatia cronica ostruttiva (BPCO) è la quarta causa di morte al mondo. È una patologia prevalentemente associata all'invecchiamento e 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. In particolare, ci siamo focalizzati sul ruolo dell'inflammasoma NLRP3 e sul metabolismo cellulare e su come il loro *cross-talk* contribuisca alla patogenesi della BPCO. Lo studio dei meccanismi molecolari alla base di questa patologia 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 Design* 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 per lo sviluppo di nuove terapie. Inoltre, il lavoro svolto in collaborazione con il gruppo di *Drug Design* 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 2018

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. Utilizzando cellule epiteliali bronchiali e macrofagi (linee cellulari e macrofagi derivati da monociti isolati dal sangue periferico, MDM) esposte a fumo di sigaretta abbiamo osservato una risposta opposta nei due tipi cellulari in riferimento all'inflammasoma NLRP3. I nostri dati suggeriscono che l'esposizione a fumo causi induzione dell'inflammasoma nell'epitelio bronchiale e al contrario inibisca l'inflammasoma NLRP3 nei macrofagi. Al contempo, il fumo appare attivare la caspasi-1 causando un importante danno metabolico. Questi dati contribuiscono a spiegare lo scenario tipico della BPCO dove l'epitelio genera infiammazione non controllata e il macrofago ha un'attività ridotta (disfunzione immunitaria). I nostri dati suggeriscono inoltre che l'attivazione della caspasi-1 associata a riduzione di NLRP3 sia un nuovo meccanismo patogenetico della BPCO e aprono nuove possibilità di intervento al fine di bloccare la progressione della malattia.

## OBIETTIVI PER IL 2019

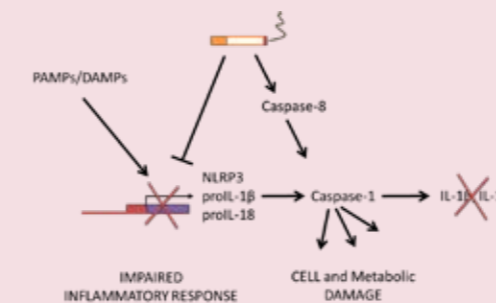
Uno dei principali obiettivi sarà la validazione e l'espansione dei dati fino ad ora ottenuti, utilizzando cellule e campioni isolati da pazienti con BPCO. Lavoreremo inoltre per comprendere i meccanismi che correlano l'inflammasoma NLRP3 con il metabolismo cellulare e la risposta infiammatoria e per capire come la regolazione congiunta di questi eventi moduli l'assetto immunitario e il fenotipo secretorio. Sul fronte dello sviluppo di inibitori di NLRP3, l'obiettivo sarà la messa a punto di saggi per *high throughput screening* al fine di testare librerie commerciali di piccole molecole e collezioni di molecole selezionate attraverso approcci di *Computer Aided Drug Design* e *Virtual Screening*.

## CONFERENZE

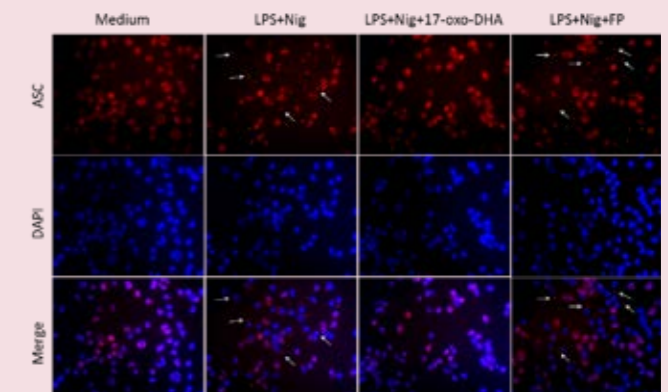
The inflammasomes-EMBO Workshop, 25-28 Settembre, 2018, Martinsried (Germania)

## PUBBLICAZIONI

- Siena L\*, Cipollina C\*, Di Vincenzo S, Ferraro M, Bruno A, Gjomarkaj M, Pace E. (2018) Electrophilic derivatives of omega-3 fatty acids counteract lung cancer cell growth. *Cancer Chemother Pharmacol*, 81, 705-716. doi: 10.1007/s00280-018-3538-3.
- Di Vincenzo S, Heijink IH, Noordhoek JA, Cipollina C, Siena L, Bruno A, Ferraro M, Postma DS, Gjomarkaj M, Pace E. (2018) SIRT1/FoxO3 axis alteration leads to aberrant immune responses in bronchial epithelial cells. *J Cell Mol Med*, 22:2272-2282. doi: 10.1111/jcmm.13509.



Proposed model: cigarette smokes inhibits the NLRP3 inflammasome in macrophages thus impairing immune responses; at the same time cigarette smoke activates Caspase-1 leading to cell and metabolic damage. PAMP, pathogen-associated molecular patterns; DAMPs, damage-associated molecular patterns.



PRODOTTI: BIOMARCATORI

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

Claudia Coronello, PhD  
ccoronello@fondazionerimed.com

## COLLABORAZIONI

Istituto di Biomedicina ed Immunologia Molecolare "Alberto Monroy (IBIM) - 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 (PA), 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 sono inclusi 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 manifestano 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 *Next Generation Sequencing*. Con le suddette tecnologie è possibile misurare contemporaneamente 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 ormai necessario, per pubblicare sulle più importanti riviste scientifiche, rendere pubblici i dati utilizzati per ottenere i risultati descritti, e qualora si tratti di profili di espressione genica, ci si avvale di banche dati come *Gene Expression Omnibus* o *ArrayExpress*. Se un ricercatore è interessato ad un particolare tessuto cellulare è probabile che abbia già a disposizione un corredo di profili di espressione da studi già pubblicati. Tali dati offrono informazione 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 coinvolti" con l'informazione su "quali sono le interazioni tra geni coinvolte".

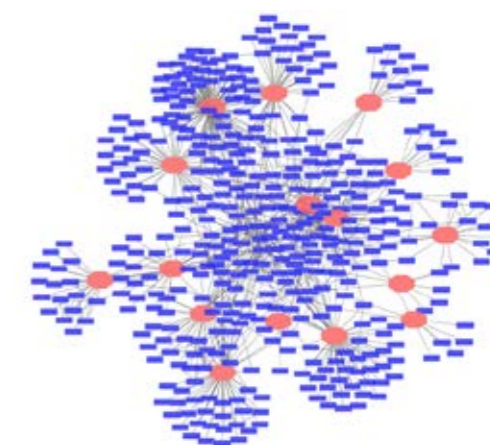
## RISULTATI RAGGIUNTI NEL 2018

Nel 2018 ci siamo dedicati alla realizzazione di un algoritmo in grado di ottenere il network di interazione microRNA-mRNA specifico di un tessuto tumorale. L'algoritmo si basa sul confronto dei profili di espressione di microRNA e di RNA-messaggero in tessuti tumorali

e tessuti normali, e ha l'obiettivo di associare ad ogni possibile interazione tra microRNA e RNA messaggero, un punteggio ottenuto attraverso una validazione statistica. I dati analizzati sono i dati contenuti nell'archivio *The Cancer Genome Atlas* (TCGA), in particolare i profili di espressione in tumore mammario e renale. L'algoritmo sviluppato risulta più selettivo rispetto ad altri algoritmi basati sulle correlazioni tra i profili di espressione e le interazioni evidenziate riguardano una lista di geni che sono funzionalmente più coordinati e sono maggiormente raggruppati nelle stesse classi di geni (*Gene Ontology*).

## OBIETTIVI PER IL 2019

Nel 2019 ci proponiamo di testare e validare ulteriormente l'algoritmo sviluppato finora. La principale difficoltà consiste nel fatto che non esiste una tecnica sperimentale in grado di evidenziare tutte le interazioni tra microRNA e RNA messaggero esistenti in un tessuto, ed è pertanto impossibile fare una validazione diretta dei network di interazione calcolati. Per proseguire con la validazione, quindi, useremo il network ricavato attraverso il nostro algoritmo come informazione aggiuntiva per ComiR, un algoritmo di predizione di target di set di microRNA che ci proponiamo di aggiornare. 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, utilizzandolo 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.



Esempio di network bipartito tra microRNA e mRNA. I nodi rossi rappresentano i microRNA, ciascuno dei quali regola centinaia di geni, rappresentati dai nodi blu. Il nostro algoritmo calcola quali relazioni tra microRNA e geni sono statisticamente significative.

# Interazione NOX2/mitocondrio nella patogenesi della malattia di Parkinson

Roberto Di Maio, PhD  
rdimaio@fondazionerimed.com



## COLLABORAZIONI

Department of Pharmacology, University of Pittsburgh, U.S.A.



## AREA TERAPEUTICA

Malattie Neurodegenerative

## PIPELINE



## BREVE DESCRIZIONE

Durante gli ultimi anni, vi è stato un crescente consenso sul fatto che i complessi eventi responsabili della patogenesi della malattia di Parkinson, siano correlati a fenomeni di stress ossidativo nella *substantia nigra pars compacta* (SNpc), eventi che influenzano la fisiologia dei neuroni dopaminergici nigrostriatali. Mentre si ritiene generalmente che lo stress ossidativo e il danno neuronale osservati nel Parkinson derivino da disfunzioni mitocondriali, recenti evidenze riportano che l'enzima NADPH ossidasi 2 (NOX2), una delle principali fonti di specie reattive dell'ossigeno (ROS) nelle cellule cerebrali, può avere un ruolo importante nell'insorgenza della malattia. Infatti, la funzione mitocondriale e NOX2 sono intimamente correlati in un processo biochimico recentemente definito "ROS-induced ROS production" (RIRP).

Sebbene ci siano pochissime informazioni sul ruolo dell'attività di NOX2 nella malattia di Parkinson, precedenti evidenze hanno fornito dati che supportano il contributo di NOX2 allo sviluppo della malattia. I nostri ultimi risultati suggeriscono che l'attività di NOX2 gioca un ruolo nella disfunzione mitocondriale, nell'attivazione di LRRK2 e nelle modificazioni neurotossiche dell'alfa-sinucleina, eventi cruciali fortemente correlati alla patogenesi del Parkinson. Questo studio si propone di fornire evidenze di neuroprotezione contro la patogenesi PD associata a NOX2 utilizzando nuovi composti che mirano specificamente a inibirne l'attività. Gli studi preclinici condotti lo scorso anno forniscono risultati promettenti che ci porteranno a ulteriori approfondimenti sull'argomento ed a possibili "trials" clinici.

## IMPATTO

I meccanismi esatti della progressiva perdita di neuroni dopaminergici nella malattia di Parkinson sono ancora poco noti. Per questa ragione, i trattamenti attuali per il Parkinson hanno mostrato bassa efficacia nel rallentare o revertire la progressione della malattia. Inoltre, il costante aumento dei casi di PD nella popolazione mondiale, indica l'urgenza di fornire approcci terapeutici nuovi ed efficaci nell'immediato futuro. In questo contesto, stiamo testando nuovi inibitori altamente specifici di NOX2 che possono avere un'efficacia "multitarget", considerato il coinvolgimento di NOX2 in diversi eventi cruciali correlati alla patogenesi del Parkinson, inclusa l'attivazione di LRRK2, la disfunzione mitocondriale, l'accumulo di alfa-sinucleina e l'attivazione di processi neuroinfiammatori. Risultati positivi di questo studio possono fornire strumenti nuovi ed efficaci per l'approccio clinico ai pazienti.



## RISULTATI RAGGIUNTI NEL 2018

Completato (pubblicato) studio *in vitro/in vivo* sulla rilevanza dell'attività della chinasi LRRK2 nella malattia di Parkinson idiopatica, identificando NOX2 come suo possibile modulatore. Completati (inediti) studi *in vitro/in vivo* sui meccanismi cellulari modulati dall'attività NOX2 durante la patogenesi del Parkinson.

### Fondi di ricerca ottenuti e/o gestiti

NIH/NINDS: 1R01 NS095387 (RDM Co-I)  $\alpha$ -Synuclein inhibition of mitochondrial protein import  
NIH/NINDS: 1R01NS100744-01 (RDM Co-I) Role of LRRK2 in idiopathic Parkinson's disease

### Premi conseguiti

Research Award: "A central role for LRRK2 in idiopathic Parkinson disease"; PSG - Meeting, Portland - OR

## Attività di docenza

University of Pittsburgh - Pittsburgh, PA  
Guest Lecturer: Neuropharmacology; - Undergraduate Neuroscience Program spring 2018  
Lecturer: Graduate Course of Neuropharmacology; spring 2018.



## OBIETTIVI PER IL 2019

Il principale obiettivo futuro è completare lo studio in modelli pre-clinici per definire la farmacocinetica (PK) e l'efficacia degli inibitori di NOX2 nel bloccare gli eventi patogenici della malattia di Parkinson. L'obiettivo a lungo termine è proporre i nuovi inibitori NOX2 per gli studi clinici come nuove terapie contro il Parkinson.



## CONFERENZE

"A central role of LRRK2 in idiopathic Parkinson's disease". Neuroscience 2018, San Diego, CA Nov. 11-16, 2018.

"NOX2/mitochondria interplay in Parkinson's disease". Neuroscience 2018, San Diego, CA - Nov. 11-16, 2018.

"NOX2/mitochondria interplay in Parkinson's disease". Gordon Research Conference, Maggio, 2018.

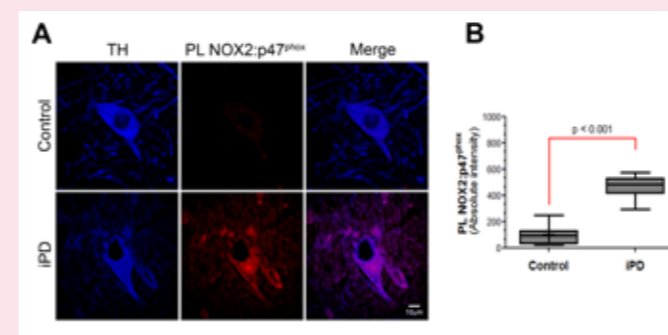


## PUBBLICAZIONI

R. Di Maio, E. K. Hoffman, E. M. Rocha, M. T. Keeney, L. H. Sanders, B. R. De Miranda, A. Zharikov, A. Van Laar, A. F. Stepan, T. A. Lanz, J. K. Kofler, E. A. Burton, D. R. Alessi, T. G. Hastings, J. Timothy Greenamyre, LRRK2 activation in idiopathic Parkinson's disease. *Sci. Transl. Med.* 10, eaar5429 (2018).

D'Aiuto L, Naciri J, Radio N, Tekur S, Clayton D, Apodaca G, Di Maio R, Zhi Y, Dimitrion P, Piazza P, Demers M, Wood J, Chu C, Callio J, McClain L, Yolken R, McNulty J, Kinchington P, Bloom D, Nimgaonkar V. (2018) Generation of three-dimensional human neuronal cultures: application to modelling CNS viral infections. *Stem Cell Res Ther.* 2018 May 11;9(1):134. doi: 10.1186/s13287-018-0881-6. PMID: 29751846.

Delicata F, Bombardi C, Pierucci M, Di Maio R, De Deurwaerdère P, Di Giovanni G. Preferential modulation of the lateral habenula activity by serotonin-2A rather than -2C receptors: Electrophysiological and neuroanatomical evidence. *CNS Neurosci Ther.* 2018 Feb 25. doi: 10.1111/cns.12830. PMID: 29479825.



A) Iperattività di NOX2 nella malattia di Parkinson idiopatica. Il metodo "Proximity Ligation Assay" (PLA) per rilevare l'interazione NOX2:p47<sup>phox</sup> - un evento cruciale per l'attivazione di NOX2 - nel tessuto cerebrale umano post-mortem rivela una significativa aumentata attività di NOX2 in campioni derivati da pazienti affetti da Parkinson, mettendo in evidenza la rilevanza di questo enzima nella malattia umana. B) Analisi quantitativa dell'attività NOX2 nei neuroni dopaminergici.

# Farmacocinetica degli elettrofili acidi grassi nitrati (NO<sub>2</sub>-FA)

Marco Fazzari, PhD  
mfazzari@fondazionerimed.com



## COLLABORAZIONI

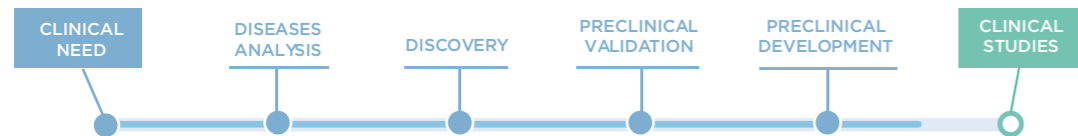
Department of Pharmacology & Chemical Biology – University of Pittsburgh School of Medicine, Pittsburgh, U.S.A.  
Department of Medicine, University of California San Francisco, San Francisco, U.S.A.



## AREA TERAPEUTICA

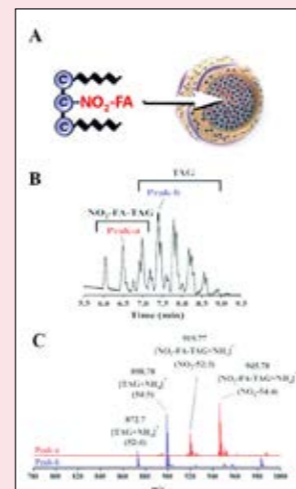
Insufficienze d'organo

## PIPELINE



## BREVE DESCRIZIONE

L'elettrofilo acido oleico nitrato (10-NO<sub>2</sub>-OA) ha mostrato risposte benefiche del segnale cellulare in studi preclinici, ha superato con successo i test di tossicità in Fase I ed è ora sottoposto a studi clinici di Fase II per il trattamento delle malattie croniche polmonari e renali. La comprensione dettagliata della farmacocinetica del 10-NO<sub>2</sub>-OA è complicata dalla capacità di alchilare i tioli in modo reversibile, di essere esterificato in vari lipidi complessi e dall'instabilità della porzione nitroalchenica durante l'idrolisi enzimatica e basica. Questo progetto di ricerca è stato ideato per migliorare la nostra comprensione riguardo la farmacocinetica di questo mediatore del segnale cellulare e nuovo candidato farmaco. Abbiamo mostrato: 1) l'esterificazione in trigliceridi come meccanismo primario della distribuzione sistemica di 10-NO<sub>2</sub>-OA e 2) la misurazione e la caratterizzazione degli isomeri di 10-NO<sub>2</sub>-OA *in vivo*.



A) Esterificazione dei NO<sub>2</sub>-FA in trigliceridi e trasporto in lipoproteine plasmatiche. B) Caratterizzazione tramite cromatografia liquida accoppiata alla spettrometria di massa ad alta risoluzione (HPLC-HR-MS) dei trigliceridi contenenti NO<sub>2</sub>-FA (NO<sub>2</sub>-FA-TAG) delle lipoproteine plasmatiche. C) L'analisi degli spettri di massa dei picchi (a) in rosso e (b) in blu mostrano rispettivamente che i NO<sub>2</sub>-FA-TAG posseggono massa dispari mentre i normali TAG hanno una massa pari.

## IMPATTO

Abbiamo mostrato che gli acidi grassi nitrati elettrofili (NO<sub>2</sub>-FA) posseggono una farmacocinetica unica, con il principale meccanismo di distribuzione tissutale che coinvolge l'esterificazione in trigliceridi (TAG). Questa compartimentalizzazione può limitare le reazioni elettrofile con nucleofili ed enzimi metabolici, come la prostaglandina reduttasi-1 (PtGR-1), e può garantire una migliore farmacocinetica e sicurezza degli elettrofili lipidici, specie che sono state tipicamente considerate tossiche. Inoltre, la preferenziale distribuzione plasmatica di 10-NO<sub>2</sub>-OA in trigliceridi suggerisce un'incorporazione nei trigliceridi dei chilomicroni e conseguente riversamento nella circolazione sistemica attraverso la vena succlavia. Ciò impedisce l'inattivazione epatica del carattere elettrofilo di 10-NO<sub>2</sub>-OA consentendo una distribuzione efficiente a organi bersaglio. Infine, la misurazione, la caratterizzazione, i nuovi metodi analitici e la descrizione *in vivo* degli isomeri di 10-NO<sub>2</sub>-OA rivelano nuove direzioni per una migliore comprensione della nitratura degli acidi grassi durante il metabolismo, l'infiammazione, e lo sviluppo di lipidi omologhi sintetici mediatori del segnale cellulare aventi migliori caratteristiche farmacocinetiche.



## RISULTATI RAGGIUNTI NEL 2018

Abbiamo riportato il meccanismo e la cinetica dell'assorbimento, del metabolismo e della distribuzione dell'acido oleico nitrato in posizione 10 (10-NO<sub>2</sub>-OA) nei cani dopo somministrazione orale. Supportati dall'analisi tramite cromatografia liquida-accoppiata alla spettrometria di massa ad alta risoluzione (HPLC-HR-MS) di trigliceridi sintetici e plasmatici contenenti 10-NO<sub>2</sub>-OA, abbiamo dimostrato che l'esterificazione iniziale in lipidi complessi è un meccanismo chiave della distribuzione dei NO<sub>2</sub>-FA. L'analisi quantitativa delle frazioni lipidiche plasmatiche non-esterificate ed esterificate ha confermato l'incorporazione preferenziale tempo-dipendente di 10-NO<sub>2</sub>-OA in trigliceridi rispetto al suo principale metabolita acido stearico nitrato in posizione 10 (10-NO<sub>2</sub>-SA). Infine, abbiamo identificato nuovi isomeri di 10-NO<sub>2</sub>-OA *in vivo* ed abbiamo caratterizzato la loro reattività elettrofila e il loro metabolismo.



## OBIETTIVI PER IL 2019

Definiremo il meccanismo di assorbimento intestinale e la distribuzione plasmatica di 10-NO<sub>2</sub>-OA nei roditori. Stabiliremo il ruolo dei chilomicroni e di altre lipoproteine sull'assorbimento e trasporto di 10-NO<sub>2</sub>-OA. Verrà utilizzato un modello di ratto con vena porta e dotto linfatico cannulati e separeremo ed analizzeremo le lipoproteine plasmatiche da campioni di sangue umani. A questo proposito, abbiamo sviluppato un'analisi cromatografica liquida-accoppiata alla spettrometria di massa (HPLC-MS/MS) per rilevare i trigliceridi contenenti 10-NO<sub>2</sub>-OA e un metodo di idrolisi acida per quantificare 10-NO<sub>2</sub>-OA non-esterificato ed esterificato nella linfa mesenterica, plasma portale e frazioni lipoproteiche. Determineremo anche l'effetto di 10-NO<sub>2</sub>-OA e dei lipidi nitro-nitrati nella regolazione dell'assorbimento dell'acqua a livello intestinale. L'azione modulatrice ed i recettori

bersaglio di 10-NO<sub>2</sub>-OA nell'omeostasi idrica intestinale chiariranno le feci acquose trovate nei modelli animali preclinici sottoposti a somministrazione orale. Il confronto tra 10-NO<sub>2</sub>-OA ed i lipidi nitro-nitrati potrebbe potenziare il valore di questi ultimi come potenziali profarmaci senza questo sgradevole effetto gastrointestinale.



## CONFERENZE

### Comunicazione orale

M. Fazzari. L'esterificazione dell'elettrofilo acido 10-nitro oleico (10-NO<sub>2</sub>-OA) è il principale meccanismo di distribuzione e trasporto sistemico. 1st Ri.MED Research Retreat, Ottobre 11-2018, Palermo, Italia.

### Poster

M. Fazzari, S.R. Salvatore, D.A. Vitturi, S.R. Woodcock, B.A. Freeman and F.J. Schopfer. Distribuzione dell'acido nitro-oleico nei trigliceridi delle lipoproteine. ASBMB Deuel Conference on Lipids, 6-9 Marzo 2018, San Diego, California, U.S.A.



## PUBBLICAZIONI

Fazzari M., Vitturi D.A., Woodcock R.S., Salvatore S., Freeman B.A. & Schopfer F.J. Esterification of electrophilic 10-nitro-oleic acid is the principal mechanism of systemic transport and distribution. Journal of Lipid Research – doi:10.1194/jlr.M088815.

Buchan G.R.\*, Bonacci G.\*, Fazzari M., Salvatore S., Wendell S.G. Nitro-fatty acid formation and metabolism. Nitric Oxide, 2018, 79, 38-44 – doi:10.1016/j.niox.2018.07.003.

Chartoumpakis D.V., Yagishita Y., Fazzari M., Palliyaguru D.L., Rao U.N.M., Zaravinos A., Khoo N.K.H., Schopfer F.J., Weiss K.R., Michalopoulos G.K., Sipula I., O'Doherty R.M., Kensler T.W., Wakabayashi N. Nrf2 prevents Notch-induced severe insulin resistance and tumorigenesis in mice. JCI Insight, 2018, 3 (5), e97735 – doi:10.1172/jci.insight.97735.

Chartoumpakis D.V., Palliyaguru D.L., Wakabayashi N, Fazzari M., Khoo N.K.H., Schopfer F.J., Sipula I., Yagishita Y., Michalopoulos G.K., O'Doherty R.M., Kensler T.W. Dissecting the effects of Nrf2 deletion in adipocytes and hepatocytes during high-fat diet-induced obesity in mice. American Journal of Physiology - Endocrinology and Metabolism, 2018, 315: E180-E195 – doi:10.1152/ajpendo.00311.2017.

D'Amore A., Fazzari M., Jiang H.B., Luketich S.K., Luketich M.E., Hoff R.F., Jacob D.E., Gu X., Badylak S.F., Freeman B.A., and Wagner W.R. Nitro-oleic acid (NO<sub>2</sub>-OA) release enhances regional angiogenesis in a rat abdominal wall defect model. Tissue Engineering Part A, 2018, Vol. 24, No. 11-12, pp-889-904 – doi:10.1089/ten.TEA.2017.0349.



## PROPRIETÀ INTELLETTUALE

Domanda provvisoria di brevetto internazionale (PCT) No. PCT/US2018/061862. Titolo: Nitro-oleic acid (NO<sub>2</sub>-OA) controlled release platform to induce regional angiogenesis in abdominal wall repair. Registrata: Nov-19-2018. Inventori: D'Amore A., Fazzari M., Freeman B., Wagner W.R.

# Azioni protettive degli acidi grassi nitrati (NO<sub>2</sub>-FA) nella malattia di Parkinson

Marco Fazzari, PhD  
mfazzari@fondazionerimed.com



## COLLABORAZIONI

Department of Pharmacology & Chemical Biology - University of Pittsburgh School of Medicine, Pittsburgh, U.S.A.  
Pittsburgh Institute for Neurodegenerative Diseases (PIND), Department of Neurology, University of Pittsburgh School of Medicine, Pittsburgh, U.S.A.



## AREA TERAPEUTICA

Patologie dell'invecchiamento

## PIPELINE



## IMPATTO

L'attivazione di risposte farmacologiche pleiotropiche da parte degli elettrofili NO<sub>2</sub>-FA rappresenta una strategia farmacologica sicura ed efficace per il trattamento di malattie come il Parkinson, che hanno una patogenesi complessa. È importante sottolineare che i NO<sub>2</sub>-FA hanno superato diversi studi umani di Fase 1 ed è in corso di valutazione in studi di Fase II relativi a malattie infiammatorie croniche.

I nostri attuali obiettivi di ricerca sono progettati per chiarire la bio-distribuzione nel cervello, il reclutamento dei target cellulari, le azioni antinfiammatorie e le risposte citoprotettive dei NO<sub>2</sub>-FA in modelli preclinici ben noti di Parkinson. Il completamento del progetto di ricerca proposto offrirà nuove informazioni sul metabolismo, la distribuzione e le concentrazioni dei NO<sub>2</sub>-FA nelle aree nigrostriatali dei ratti sia maschi che femmine. Inoltre, il nostro piano di ricerca valuterà la neuroprotezione dei NO<sub>2</sub>-FA, attraverso una riduzione dello stress ossidativo, neuroinfiammazione e miglioramento dei sintomi motori. Poiché la malattia di Parkinson è una malattia sinora incurabile, il nostro contributo è significativo perché i NO<sub>2</sub>-FA potrebbero fornire un nuovo approccio farmacologico



## RISULTATI RAGGIUNTI NEL 2018

Abbiamo dimostrato che i NO<sub>2</sub>-FA attraversano la barriera emato-encefalica nei ratti dopo somministrazione orale. Inoltre, abbiamo valutato la distribuzione mitocondriale di un omologo dei NO<sub>2</sub>-FA nei macrofagi dopo la reazione "click". Questa specifica localizzazione cellulare è stata ottenuta sintetizzando un alchino derivato dei NO<sub>2</sub>-FA che può rispettivamente reagire con i residui proteici della cisteina e indurre la reazione "click" con una specifica sonda fluorescente in cellule. Inoltre, abbiamo sviluppato e convalidato un nuovo test di legame della prossimità (PL) che può fornire rapidamente informazioni sullo stato di attivazione e sulla localizzazione cellulare di Nox2.

È importante sottolineare che le NADPH ossidasi (Noxs) generano specie reattive dell'ossigeno (ROS) nei neuroni e nelle cellule della microglia ed è stato recentemente suggerito il loro coinvolgimento nel morbo di Parkinson. Quindi, utilizzando questo nuovo saggio, abbiamo osservato che i NO<sub>2</sub>-FA inibiscono in modo consistente l'attività Nox2 nelle cellule N27 neurali dopaminergiche trattate con rotenone.



## OBIETTIVI PER IL 2019

Gli obiettivi di questa linea di ricerca sono: 1) Definire il potenziale neuroprotettivo dei NO<sub>2</sub>-FA attraverso la modulazione dell'espressione genica di Nrf2- e NF-kB-dipendente e l'inibizione dell'attività di Nox-2 in un modello in vitro di Parkinson, 2) Valutare la farmacocinetica dei NO<sub>2</sub>-FA nel mesencefalo e i suoi effetti neuroprotettivi in un modello di rotenone di Parkinson nel ratto. Questi risultati sveleranno i meccanismi di protezione dei NO<sub>2</sub>-FA nel Parkinson e stabiliranno una solida premessa scientifica per un finanziamento RO1 volto a tradurre questi risultati in modelli animali preclinici altamente rilevanti tra cui il modello di ratto con sovraespressione dell' $\alpha$ -sinucleina umana nella *substantia nigra* mediata dal virus 2 adeno-associato (AAV2).

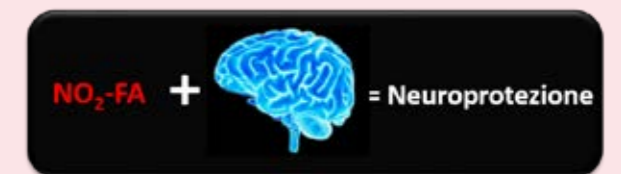


## BREVE DESCRIZIONE

Una cura efficace per la malattia di Parkinson è un'esigenza non soddisfatta, poiché i trattamenti attuali non sono riusciti a rallentare o invertire la progressione della malattia. Gli esatti meccanismi della perdita selettiva delle cellule nigrostriatali nella malattia di Parkinson sono ancora poco compresi, ma vi è un crescente consenso sul fatto che lo stress ossidativo e la neuroinfiammazione giocano un ruolo fondamentale. A questo proposito, nuove strategie farmacologiche basate sull'attivazione antiossidante Nrf2-dipendente, sulle risposte

di riparazione tissutale, sull'inibizione dell'espressione delle citochine proinfiammatorie e molecole di adesione NF-kB-dipendente e sull'attività della NADPH ossidasi-2 (NOX-2), hanno mostrato risultati promettenti nella terapia del Parkinson. Gli elettrofili acidi grassi nitrati (NO<sub>2</sub>-FA) hanno dimostrato azioni protettive e anti-infiammatorie in multipli modelli preclinici, hanno superato 5 studi clinici di Fase 1 in 107 soggetti e sono ora in studi di Fase II correlati al trattamento delle malattie croniche polmonari e renali. In particolare, abbiamo

appena scoperto che i NO<sub>2</sub>-FA attraversano facilmente la barriera emato-encefalica. Da questa osservazione, si ipotizza che i NO<sub>2</sub>-FA accedano alla regione nigrostriatale del cervello e inibiscano lo stress ossidativo e la neurodegenerazione nel Parkinson attraverso la modulazione dell'espressione genica Nrf2- e NF-kB-dipendente e l'inibizione della compromissione mitocondriale e dell'attività proinfiammatoria dell'NADPH ossidasi-2 (Nox-2). Quindi, proponiamo di studiare modelli preclinici per definire l'efficacia dei NO<sub>2</sub>-FA nel limitare la patogenesi del Parkinson.



# Farmacologia dei lipidi nitro-nitrati

Marco Fazzari, PhD  
mfazzari@fondazionerimed.com



## COLLABORAZIONI

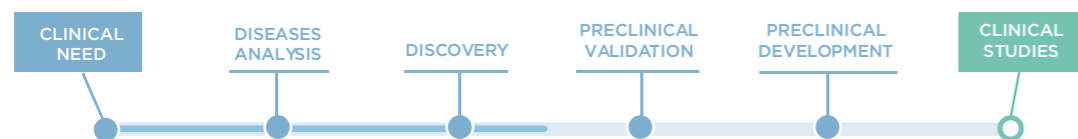
Department of Pharmacology & Chemical Biology - University of Pittsburgh Medical Center, Pittsburgh, U.S.A.



## AREA TERAPEUTICA

Patologie dell'invecchiamento

## PIPELINE



## IMPATTO

La ricerca proposta fornirà informazioni sulla generazione e sulle funzioni biologiche protettive dei derivati lipidici nitro-nitrati, una nuova classe di mediatori del segnale cellulare già coperti da una recente domanda provvisoria di brevetto internazionale (PCT).

L'importanza fondamentale del progetto di ricerca è la caratterizzazione di un prodotto metabolico e infiammatorio endogeno sia come mediatore del segnale cellulare che come potenziale strategia farmacologica per limitare il danno vascolare e cardiopolmonare derivante da stress metabolico e infiammatorio.

Questo progetto crea una base di conoscenza per il potenziale sviluppo di questo nuovo prodotto di reazioni nitrossidative come nuovo candidato farmaco.



## OBIETTIVI PER IL 2019

Dopo aver ideato ed eseguito strategie di sintesi organica per ottenere grammi di  $\text{NO}_2+\text{NO}_3\text{-CLA}$  standard puri non-esterificati ed esterificati, definiremo i meccanismi digestivi e infiammatori che portano al posizionamento concertato sia del gruppo  $-\text{NO}_2$  che del gruppo  $-\text{ONO}_2$  su un acido grasso insaturo ed esterificato in TAG. Il piano di ricerca valuterà quindi a) il metabolismo dei derivati  $\text{NO}_2+\text{NO}_3\text{-CLA}$  e b) le risposte *in vitro* e *in vivo* a  $\text{NO}_2+\text{NO}_3\text{-CLA}$ , con particolare attenzione al potenziale per questa classe di mediatori del segnale cellulare di agire tramite meccanismi cGMP-dipendente e cGMP-indipendente.

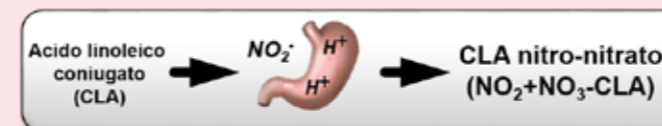
I dati preclinici e clinici attuali supportano che la somministrazione orale di  $\text{NO}_2\text{-FA}$  induce risposte salutari a livello di espressione genica mitigando eventi patogeni indotti dall'obesità e dall'infiammazione. Prevediamo che i derivati  $\text{NO}_2+\text{NO}_3\text{-CLA}$  possano essere anche i precursori del  $\text{NO}_2\text{-FA}$  già rilevati nei roditori, nell'uomo e nelle piante.



## BREVE DESCRIZIONE

L'ambiente acido gastrico favorisce un'efficace nitratura degli acidi grassi insaturi e la formazione endogena di acidi grassi nitrati ( $\text{NO}_2\text{-FA}$ ). Queste specie mediano effetti salutari in numerose malattie infiammatorie attraverso modificazioni proteiche post-traslazionali che modulano percorsi significativi del segnale cellulare. L'acido linoleico coniugato (CLA) è un substrato preferenziale per la nitratura degli acidi grassi ed in presenza di nitrito ( $\text{NO}_2^-$ ) e di basso pH gastrico viene convertito nell'elettrofilo acido linoleico coniugato nitrato ( $\text{NO}_2\text{-CLA}$ ). Recentemente, nelle stesse condizioni abbiamo scoperto e caratterizzato gli endogeni CLA nitro-nitrati ( $\text{NO}_2+\text{NO}_3\text{-CLA}$ ).

Questi sono profarmaci che si attivano a pH fisiologico generando acido linoleico coniugato nitrato ( $\text{NO}_2\text{-CLA}$ ) e rilasciando specie nitrosanti derivati dell'ossido nitrico (NO), con una potenziale modulazione rispettivamente dei percorsi cGMP-indipendenti/dipendenti. Quindi, la decomposizione di  $\text{NO}_2+\text{NO}_3\text{-CLA}$  potrebbe indurre non solo azioni antiossidanti e citoprotettive proprie dei  $\text{NO}_2\text{-FA}$  ma anche vasodilatazione mediata dall'ossido nitrico (NO). La ricerca proposta definirà i meccanismi di generazione mediati dalla dieta e dall'infiammazione, i percorsi ottimali per la sintesi organica e i percorsi del segnale cellulare di questa classe di lipidi strutturalmente unica.



## PROPRIETÀ INTELLETTUALE

Domanda di Brevetto internazionale N. PCT/US2017/055154.  
Titolo: Novel reversible nitroxide derivatives of nitroalkenes that mediate nitrosating and alkylating reactions. Filed: Oct-04, 2017.  
Inventors: Fazzari M., Schopfer F. and Freeman B.

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

Ugo Perricone, PhD  
uperricone@fondazionerimed.com

## COLLABORAZIONI

Università della Campania Luigi Vanvitelli, – Dipartimento di Medicina di Precisione - Napoli Italia

## AREA TERAPEUTICA

Cancro

## PIPELINE



## BREVE DESCRIZIONE

I processi epigenetici sono meccanismi essenziali nello sviluppo e 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 particolare modo, KDM4A è frequentemente amplificato e overespresso 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) alla base delle patologie tumorali. Il disegno razionale delle molecole prevede diversi approcci tra cui la creazione di modelli *In Silico* creati sulle proteine target, oggetto del nostro studio, e la loro validazione in modo retrospettivo. Questi modelli vengono utilizzati per il *virtual screening* e il *molecular modeling* al fine di identificare potenziali *Hit compounds*, attraverso tecniche computazionali e guidare la sintesi chimica verso composti che passano da un profilo di hit compound a uno di *lead compound*.

## 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 agiscano a livello dei meccanismi epigenetici.

## RISULTATI RAGGIUNTI NEL 2018

Durante il 2018 sono stati messi a punto i modelli computazionali che potessero servire per la progettazione razionale di molecole ad attività inibitoria sul target. In particolare ci si è concentrati 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 3 molecole hit che sui saggi biochimici preliminari hanno mostrato attività uM su KDM4. Le stesse molecole hanno dato risultati interessanti anche dal punto di vista dell'inibizione della proliferazione cellulare su cellule di tipo HCT-116. Sulla base dei risultati ottenuti dagli *screening*, si è passati alla progettazione di analoghi strutturali delle *hit series* con l'obiettivo di migliorarne il profilo di attività.

## OBIETTIVI PER IL 2019

Per il 2019 l'obiettivo del progetto è la progettazione e la sintesi di molecole *in house* da cui verrà scelta una *hit* con attività nel range basso uM con buon profilo di tossicità e selettività verso la KDM4A rispetto alle altre KDMs da poter sviluppare ulteriormente ottimizzandone il profilo come *lead compound*. Particolare attenzione verrà data inoltre alla capacità di modulazione delle due principali forme di demetilasi coinvolte nella patologia tumorale oggetto di studio (KDM4A e KDM4C). L'attività della molecola sarà valutata sia dal punto di vista biologico con saggi enzimatici (sulle isoforme A e C dell'enzima) e saggi cellulari che tecniche biofisiche (ITC, NMR) che consentiranno di elucidare le porzioni maggiormente coinvolte nell'interazione *host-guest*. Ciò permetterà inoltre l'ulteriore elucidazione del *binding mode* e la conseguente validazione prospettiva dei modelli *In Silico* utilizzati per la predizione del modo di *binding* delle molecole.



Raggio X dell' Inibitore QC6352 legato al sito di binding di KDM4A



# 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. Il laboratorio è strategicamente posizionato presso l'IRCCS ISMETT e 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. La nuova generazione di vaccini, costituita da proteine ricombinanti, è diretta alla cura delle infezioni di maggiore interesse ospedaliero di diversa eziologia.



**Immunoterapia NK-mediata per il trattamento e/o la prevenzione della recidiva HCC e/o HCV post-trapianto**

Ester Badami, PhD

**Cellule Dendritiche regolatorie nella prevenzione del rigetto di organo**

Ester Badami, PhD

**Produzione del secretoma di cellule mesenchimali stromali (MSCs) umane e potenziale uso clinico**

Cinzia Chinnici, PhD

**Funzione delle globine ed effetto del nitrito nella rigenerazione cardiaca e durante lo sviluppo embrionale**

Paola Corti, PhD

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

Bruno Douradinha, PhD

**Sviluppo di un vaccino contro l'HIV basato su ceppi di *S. cerevisiae* geneticamente modificati**

Bruno Douradinha, PhD

**Sorveglianza e caratterizzazione di ceppi batterici multiresistenti di rilevanza clinica**

Bruno Douradinha, PhD

**Rigenerazione di un fegato in sedi ectopiche**

Maria Giovanna Francipane, PhD

**Rigenerazione un rene in sedi ectopiche**

Maria Giovanna Francipane, 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




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

# Immunoterapia NK-mediata per il trattamento e/o la prevenzione della recidiva HCC e/o HCV post-trapianto

Ester Badami, PhD  
ebadami@fondazionerimed.com

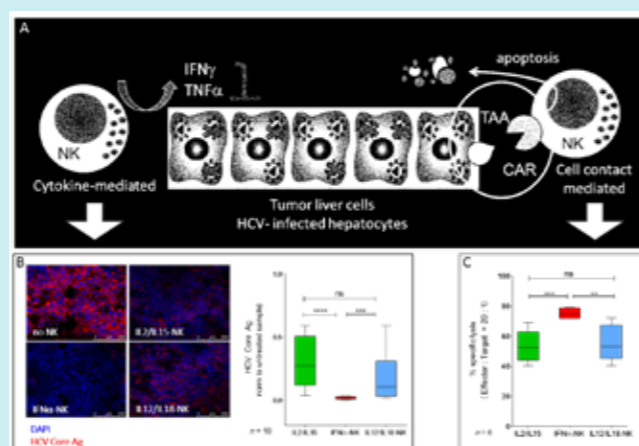
 **COLLABORAZIONI**  
Istituto Zooprofilattico Sicilia IZS, Palermo, Italia

 **AREA TERAPEUTICA**  
Cancro  
Insufficienze d'organo



## BREVE DESCRIZIONE

Le cellule Natural Killer (NK) agiscono contro tumori ed infezioni. Nel contesto del trapianto di fegato, le cellule NK rappresentano le cellule ideali allo scopo. Primo, un elevato numero di cellule NK vitali e funzionali può essere isolato contestualmente al trapianto di fegato dal perfusato epatico, dove sono particolarmente arricchite, in modo da consentire l'immediato trattamento del paziente trapiantato di fegato limitando le possibilità di recidiva. La tempistica di azione, infatti, potrebbe essere fondamentale per aumentare le possibilità di successo della terapia. Secondo, le cellule NK non sono soggette alla soppressione funzionale indotta dall'immunoterapia soppressiva post-trapianto che invece è specifica per i linfociti T.



Le cellule Natural Killer (NK) percepiscono la presenza di cellule somatiche alterate da infezioni e tumori adottando due meccanismi: rilascio di citochine o induzione di apoptosi attraverso contatto cellulare (A). È possibile aumentare la funzione delle cellule NK con citochine (e.g. IFN $\alpha$  piuttosto che IL2/IL15 o IL12/IL18), sia mediata da fattori solubili (B) che tramite contatto cellulare (C). Le NK possono essere ingegnerizzate per esprimere recettori per antigeni tumorali aumentando così la specificità per le cellule target (CAR).

## IMPATTO

L'incidenza dell'epatocarcinoma cellulare (HCC) rappresenta la quinta causa di malignità e la seconda causa di mortalità da tumore nella popolazione di maschi adulti. Nel circa l'80% dei casi, l'epatocarcinoma è associato ad una infezione cronica da virus dell'epatite C (HCV).

Il virus dell'epatite C infetta prevalentemente gli epatociti umani, stabilendo infezione cronica del fegato che determina cirrosi, scompenso epatico, epatocarcinoma e disfunzione epatica. L'HCV determina infezione cronica nel 60-80% dei pazienti in quanto il virus evade efficientemente le difese immunitarie inibendo la funzione delle cellule coinvolte nella risposta innata ed adattativa.

Non esiste ad oggi un vaccino anti-HCV. I nuovi farmaci ad azione antivirale diretta hanno concretamente segnato un traguardo importante nella cura della infezione da HCV. Tuttavia, ad oggi non si hanno ancora informazioni sugli effetti collaterali del trattamento a lungo termine come ad esempio la comparsa di sostituzioni virali farmaco-resistenti (RASs), gli effetti sul tumore epatico in pazienti con HCC associato all'infezione HCV o sugli effetti collaterali extraepatici.

Infine, i costi del trattamento sono ancora molto elevati e non accessibili a tutte le categorie di pazienti infetti. L'HCC e l'HCV rappresentano indicazioni al trapianto di fegato.

Tuttavia, la recidiva HCV post-trapianto si verifica nella quasi totalità dei pazienti non trattati farmacologicamente, mentre la ricorrenza di epatocarcinoma si manifesta nel 10-60% dei pazienti 1-2 anni dopo il trapianto. Le cellule *Natural Killer* (NK) rappresentano una delle prime linee di difesa contro le infezioni virali e contro i tumori.

Le cellule NK vengono utilizzate nell'immunoterapia adottiva anti-tumorale da decenni sia in auto- che in allo-trapianto.

La possibilità di utilizzare cellule NK nella prevenzione della recidiva HCC ed HCV a seguito del trapianto di fegato è oggetto di ricerca.

L'ipotesi è che l'infusione nel paziente trapiantato di fegato di cellule NK isolate dal donatore sano al momento del trapianto ne rafforzi le difese immunitarie, compromesse dalla terapia anti-rigetto che accompagna il trapianto di organo. Inoltre, è noto che nei pazienti affetti da infezione HCV cronica e/o con tumore epatico, il sistema immunitario è debilitato.

Pertanto il ripristino delle difese immunitarie del ricevente si ottiene utilizzando cellule NK provenienti da un donatore sano nelle fasi immediatamente successive al trapianto anche in combinazione con i farmaci antivirali ed antitumorali ad oggi disponibili. Alcuni studi hanno provato che pazienti con HCV curati con i DAAs sviluppano HCC. L'utilizzo combinato dei farmaci DAAs in combinazione con le cellule NK potrebbe fortemente prevenire lo sviluppo dell'HCC.

## RISULTATI RAGGIUNTI NEL 2018

I nostri studi preliminari *in vitro* hanno dimostrato che è possibile indirizzare la funzione delle cellule NK verso un fenotipo anti-virale ed anti-tumorale più efficiente. L'attivazione di cellule NK con le citochine [IL2 + IL15] e [IFN $\alpha$ ] piuttosto che con il mix di citochine [IL2 + IL15] e [IL12 + IL18] oppure con la sola combinazione di [IL2 + IL15], attiva le cellule NK conferendo un'attività anti-HCV ed anti-HCC superiore. Caratterizzazione dei pathways di attivazione ed identificazione dei seguenti:

- miRNA differenzialmente espressi da cellule NK attivate con [IFN $\alpha$ ]: hsa-miR-1304-3p e hsa-miR-181a-3p.
- proteine solubili maggiormente rilasciate dalle NK attivate con [IFN $\alpha$ ]: proteina TRAIL solubile.
- esclusione che il fattore solubile determinante la maggiore attività anti-virale ed anti-tumorale delle NK attivate con [IFN $\alpha$ ] siano i Type I IFN (blocking assay).

## OBIETTIVI PER IL 2019

*Proof-of-concept in vivo* della funzione anti-tumorale delle cellule NK attivate con IFN $\alpha$  in un modello murino di epatocarcinoma. I topi immuno-compromessi verranno impiantati ortotopicamente con una linea cellulare umana di tumore epatico e trattati con cellule NK attivate con IL12/IL18 o IFN $\alpha$ . La crescita del tumore verrà tracciata tramite *Imaging* per Risonanza Magnetica (MRI) nei topi vivi utilizzando uno strumento Bruker 7 Ts.

Caratterizzazione funzionale dei miRNA individuati.

## CONFERENZE

Meeting annuale della Società per l'Immunità Naturale (SNI) "NK2018", Maggio, 2018, San Antonio, Texas, USA  
European Congress of Immunology ECI2018, Settembre, 2018, Amsterdam, Olanda.

## PUBBLICAZIONI

Gallo A, Miele M, Badami E, Conaldi PG. (2018) Molecular and cellular interplay in virus-induced tumors in solid organ recipients. *Cell Immunol.*, 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. (2018) Liver Perfused Natural Killer Cells from Deceased Brain Donors and Association with Acute Cellular Rejection after Liver Transplantation: a Time-To-Rejection Analysis. *Transplantation*. DOI: 10.1097/TP.0000000000002322.

## PROPRIETÀ INTELLETTUALE

Numero brevetto internazionale WO 2018/099988, 15 Febbraio 2018, "Immunoterapia NK-mediata e usi di essa".

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

# Cellule Dendritiche regolatorie nella prevenzione del rigetto di organo

Ester Badami, PhD  
ebadami@fondazionerimed.com

 **COLLABORAZIONI**  
Starzl Institute, University of Pittsburgh, U.S.A.

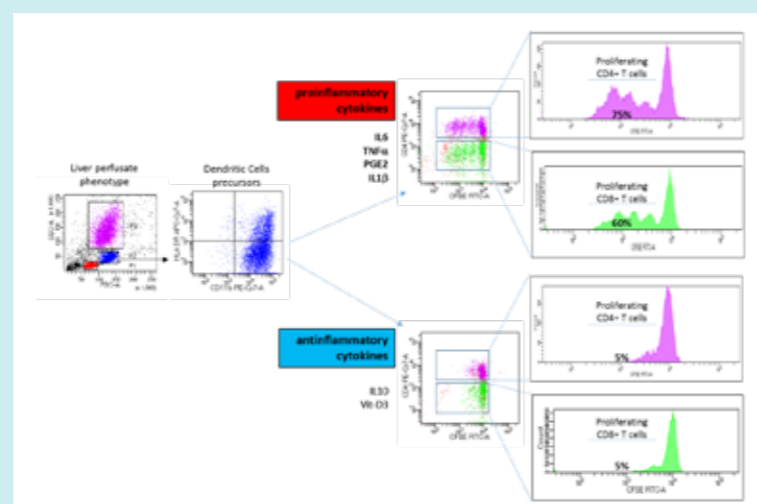
 **AREA TERAPEUTICA**  
Insufficienze d'organo

**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 trapianti di fegato. Determineremo se è possibile isolare dal fegato DCreg pronte per essere trapiantate, a seguito del trapianto di fegato, nel ricevente per indurre tolleranza allo-specifica. 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.



Il perfusato epatico è ricco di precursori delle cellule dendritiche (DCs), le quali possono essere manipolate *in vitro* per ottenere la risposta immunitaria desiderata: coltura con citochine infiammatorie induce una risposta proliferativa dei linfociti T CD4+ eCD8+ (in alto a destra). Al contrario, maturazione delle DCs in presenza di IL10 e VitD3 sortisce l'effetto contrario e stasi linfocitaria (in basso a destra).

 **IMPATTO**

I pazienti trapiantati di organo solido sono soggetti ad immunoterapia soppressiva per il resto della 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 a 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 del 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.

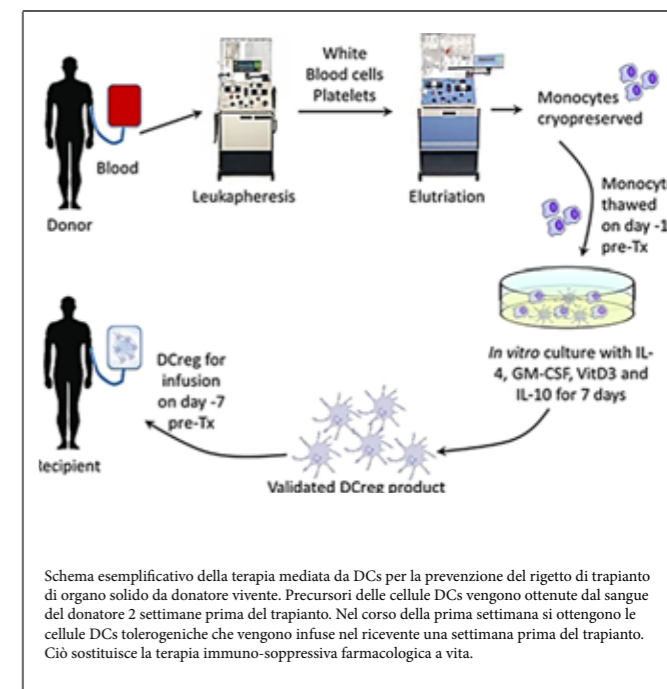
 **RISULTATI RAGGIUNTI NEL 2018**

Il progetto è di recente inizio. Per prima cosa è stato necessario dimostrare che il perfusato epatico fosse utilizzabile come fonte alternativa di cellule dendritiche o loro precursori. L'analisi del fenotipo del perfusato epatico ottenuto da circa

20 donatori cadavere, ha dimostrato la presenza di una discreta popolazione di monociti CD14+, precursori delle cellule dendritiche. Più difficile è stato validare la presenza di cellule dendritiche tollerogeniche già differenziate nel perfusato. Idealmente la possibilità di isolare cellule dendritiche tollerogeniche già differenziate dal perfusato nel contesto del trapianto di fegato, avrebbe dato l'opportunità di trattare i riceventi con cellule Tol-DCs nelle ore successive al trapianto. Tuttavia, la presenza dei precursori differenziabili utilizzando il protocollo validato di Pittsburgh, consente la produzione di Tol-DCs da potere infondere anche qualche giorno dopo il trapianto, processo dimostrandosi altrettanto efficace della infusione di cellule pre-trapianto dai nostri collaboratori in esperimenti pre-clinici.

 **OBIETTIVI PER IL 2019**

Ottimizzazione della produzione di cellule Tol-DCs dai monociti CD14+ isolati dal perfusato epatico. Caratterizzazione funzionale delle DCs derivate dai monociti in assay *in vitro* utilizzando linfociti T allo-reattivi. Ottimizzazione della procedura di produzione delle Tol-DCs secondo gli standard ATMP per trattamento di pazienti. Riproduzione del protocollo di Pittsburgh utilizzando come risorsa cellulare prodotti di aferesi, sangue periferico da donatore vivente per iniziare uno studio multicentrico condotto negli Stati Uniti ed in Italia.



Schema esemplificativo della terapia mediata da DCs per la prevenzione del rigetto di trapianto di organo solido da donatore vivente. Precursori delle cellule DCs vengono ottenute dal sangue del donatore 2 settimane prima del trapianto. Nel corso della prima settimana si ottengono le cellule DCs tollerogeniche che vengono infuse nel ricevente una settimana prima del trapianto. Ciò sostituisce la terapia immuno-soppressiva farmacologica a vita.

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

# Produzione del secretoma di cellule mesenchimali stromali (MSCs) umane e potenziale uso clinico

Cinzia Chinnici, PhD  
cchinnici@fondazionerimed.com

## COLLABORAZIONI

IRCCS-ISMETT, Palermo, ITA (Leading Partner)  
Laboratorio Polimeri Biocompatibili, STEBICEF – Università di Palermo, Palermo, ITA

## AREA TERAPEUTICA

Insufficienze d'organo

## PIPELINE



## BREVE DESCRIZIONE

Il secretoma delle MSCs costituisce una terapia avanzata di tipo cell-free da proporre in Medicina Rigenerativa per il ripristino della funzionalità d'organo. MSC-secretoma contiene una vasta gamma di fattori solubili (fattori di crescita, chemochine, esosomi) ad azione immunomodulatrice e trofica tale da consentire il trattamento di varie patologie. In particolare, abbiamo verificato un marcato effetto proangiogenico del secretoma di MSCs isolate da cordone ombelicale seguite dalle MSCs da derma fetale. Perciò, l'uso di tale secretoma sarebbe particolarmente indicato nel *tissue repair/regeneration* e *wound healing*, dal momento in cui l'angiogenesi è un aspetto cruciale del riparo del tessuto. L'obiettivo dello studio è di valutare i benefici della *secretome-*

*based therapy* nel ripristinare la funzionalità di fegato e cute. La scelta di un organo interno e di un organo esposto non è casuale, ma consentirà di valutare differenti rotte/modalità di somministrazione del secretoma stesso (sistemica nel caso di organi interni; topica nel caso di organi esposti). A questo proposito, un aspetto centrale dello studio riguarda l'uso di materiali biocompatibili/biodegradabili che consentano un rilascio controllato del secretoma stesso durante le applicazioni cliniche. A differenza delle cellule trapiantate in grado di effettuare l'homing e raggiungere il tessuto danneggiato, il secretoma necessita di essere accoppiato a *scaffold* che ne garantiscano l'efficacia.

## IMPATTO

L'uso del secretoma come terapia "cell-free" presenta vantaggi molteplici rispetto alla terapia cellulare tradizionale poiché limiterebbe i rischi potenziali legati alla somministrazione di cellule (reazioni di rigetto, tumorigenicità, trasmissione di infezioni). Inoltre, una volta raccolto sotto forma di terreno condizionato (CM), il secretoma può essere preparato con largo anticipo, liofilizzato e stoccato per aumentarne la stabilità, adoperato come prodotto "ready-to-use" nel caso di patologie di tipo acuto che richiedano una certa tempestività (ad esempio in caso di epatite fulminante).

## RISULTATI RAGGIUNTI NEL 2018

È stato condotto uno studio comparativo dei terreni condizionati (CM) ottenuti da MSCs isolate da fonti differenti: derma fetale, fegato fetale e cordone ombelicale. I CM sono stati caratterizzati ed è stata determinata la presenza di fattori di crescita e chemochine con un ruolo in angiogenesi/*tissue repair/regeneration* e *wound healing*. I saggi di angiogenesi *in vitro* hanno evidenziato una marcata azione proangiogenica del CM di MSCs da cordone ombelicale rispetto al CM degli altri tipi cellulari. Inoltre, l'analisi di vescicole extracellulari rilasciate dalle MSCs ha evidenziato la presenza di esosomi (diametro di 70-100 nm) in grado di stimolare risposte biologiche in cellule target con elevata efficienza. Per quanto riguarda gli esosomi delle MSCs fetali dermiche, è stata valutata l'espressione di microRNA (miRNAs) regolatori di angiogenesi che sono risultati significativamente up-regolati nelle MSCs fetali rispetto alla controparte adulta (manoscritto in preparazione).

Per quanto riguarda lo studio dei sistemi di rilascio del secretoma, svolto in collaborazione con il laboratorio di Polimeri Biocompatibili dello STEBICEF, sono stati raggiunti risultati

promettenti (manoscritto in preparazione) individuando negli *hydrogels* di acido ialuronico un efficiente sistema per rilascio controllato del nostro secretoma. In particolare, sono stati condotti studi di cinetica di rilascio *in vitro* che permetteranno di definire le modalità di applicazione *in vivo* del secretoma (applicazione topica di *hydrogel/secretoma* in modelli animali di ferite cutanee croniche).

Per quanto riguarda lo studio preclinico approvato ("Valutazione di safety ed efficacia di cellule umane fetali epatiche e del loro terreno condizionato nel ripristinare la funzionalità epatica in un modello murino di epatite fulminante"), è stato condotto uno studio pilota presso l'Istituto Zooprofilattico (luglio 2018) che ha permesso di riprodurre il modello murino di danno epatico acuto indotto da D-galattosammina/LPS. Il danno epatico è stato valutato in termini di livelli sierici di transaminasi AST e ALT e osservazioni istologiche. Inoltre, per quanto riguarda le cellule/trattamento da adoperare nel suddetto studio (fetal liver-MSCs) è stata approfondita la caratterizzazione di tali cellule includendo l'attività funzionale del CM e l'analisi degli esosomi. Il manoscritto è stato recentemente accettato.

## OBIETTIVI PER IL 2019

- 1) Conduzione dello studio preclinico "Valutazione di safety ed efficacia di cellule umane fetali epatiche e del loro terreno condizionato nel ripristinare la funzionalità epatica in un modello murino di epatite fulminante".
- 2) Valutare la brevettabilità di una metodica per ottenere un secretoma funzionale direttamente in reagenti "clinical grade".
- 3) Approfondire lo studio di materiali biocompatibili/biodegradabili per il rilascio controllato del secretoma (ad esempio, microparticelle caricate con secretoma).
- 4) Stesura del protocollo di uno studio preclinico che riguardi l'applicazione topica di *hydrogel/secretoma* per il trattamento di ferite cutanee croniche (*wound healing*).

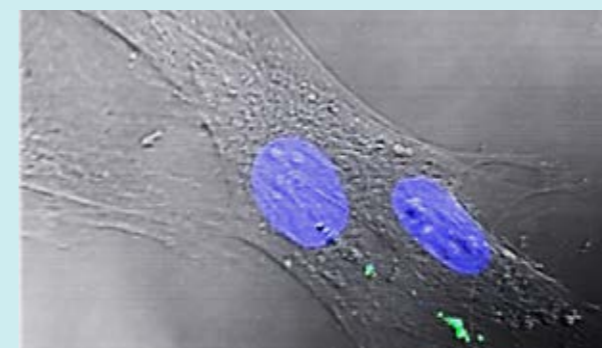


Immagine in campo chiaro, ottenuta sovrapponendo fluorescenza verde (CSFE) e blu (DAPI), mostrandone la presenza di esosomi da MSC nel citoplasma di cellule target

## CONFERENZE

Global Summit on Stem Cell & Tissue Engineering. Barcelona, 23, 24 luglio 2018.

Poster: Collection and preliminary *in vitro* characterization of a functional secretome from human multipotent fetal dermal cells (CM Chinnici, S Vella, G Amico, and PG Conaldi).

## PUBBLICAZIONI

Chinnici CM, Pietrosi G, Iannolo G, Amico G, Cuscino N, Pagano V, Conaldi PG. Mesenchymal stromal cells from human fetal liver release growth factors and chemokines with a potential role in liver tissue repair. 2018 Dec 5;105:14-26. doi: 10.1016/j.diff.2018.12.001.

# Funzione delle globine ed effetto del nitrito nella rigenerazione cardiaca e durante lo sviluppo embrionale

Paola Corti, PhD  
pcorti@fondazionerimed.com

## COLLABORAZIONI

Istituto di Bioscienze e Biorisorse (IBBR) - CNR, Napoli, Italia  
Dipartimento di BioScienze - Università degli Studi di Milano, Italia

## AREA TERAPEUTICA

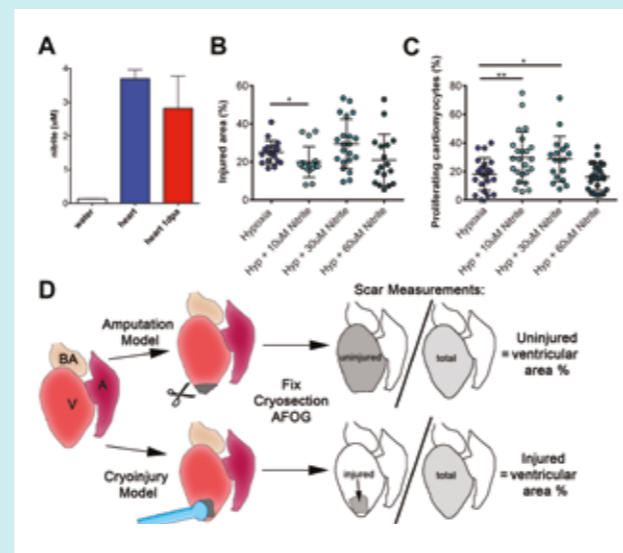
Insufficienze d'organo

## PIPELINE



## BREVE DESCRIZIONE

Recentemente sono stati identificate nei vertebrati nuove proteine appartenenti alla famiglia delle globine come la citoglobina (Cygb) e la globina X (Xgb). Sebbene altamente conservata, la funzione di queste proteine rimane in gran parte sconosciuta. Una caratteristica importante è la capacità di queste globine di convertire il nitrito a ossido di azoto (NO) in condizioni di scarso ossigeno. Questa reazione si è dimostrata fisiologicamente rilevante in uomo durante gli eventi ischemici o ipossici e la somministrazione di nitrito ha effetti citoprotettivi e anti-apoptotici notevoli. Nell'attuale proposta, ho in programma di utilizzare il modello zebrafish per definire il ruolo di queste globine nella rigenerazione del cuore di zebrafish e durante lo sviluppo embrionale. Lo zebrafish è un modello consolidato e sempre più importante per lo studio dello sviluppo embrionale, dell'organogenesi e della fisiologia degli adulti. Inoltre, zebrafish è in grado di rigenerare il tessuto cardiaco in seguito a un danno cardiaco e quindi offre l'opportunità unica di scoprire i meccanismi molecolari coinvolti nella riparazione del cuore. L'obiettivo della mia ricerca è quello di caratterizzare come le globine funzionano nel cuore e possibilmente mediare l'effetto benefico del nitrito durante la rigenerazione cardiaca.



## IMPATTO

Obiettivo della ricerca è arrivare alla piena comprensione della funzione biologica delle globine e dell'effetto del nitrito *in vivo*, che - per la prima volta - saranno studiati in un modello di rigenerazione del cuore in zebrafish. Queste indagini chiariranno la funzione attualmente sconosciuta delle globine cellulari e forniranno una migliore conoscenza degli eventi rigenerativi cardiaci. Il ruolo dei nitriti nei processi di rigenerazione è sconosciuto. Il nostro lavoro mostra che sotto ipossia, i livelli fisiologici di nitrito sono in grado di migliorare la capacità riparatoria del cuore in seguito a lesioni del tessuto cardiaco. Il nitrito migliora la rigenerazione modulando la risposta immunitaria attraverso il *signaling* molecolare di ossido di azoto (NO); il reclutamento più rapido di trombociti, neutrofili e macrofagi accelera la proliferazione dei cardiomiociti, l'angiogenesi e la riparazione cardiaca. Interventi di questo tipo, mirati a modulare il *signaling* di NO, possono fornire un'opportunità per migliorare i risultati in condizioni di ipossia come la chirurgia cardiaca intrauterina fetale o neonatale.

## RISULTATI RAGGIUNTI NEL 2018

I nostri risultati preliminari mostrano che l'esposizione al nitrito ha migliorato il programma di rigenerazione cardiaca e aumentato la proliferazione dei cardiomiociti. Globin X (Xgb) e citoglobina 1 (Cygb1) sono due importanti candidati per la conversione del nitrito e potenzialmente svolgono un ruolo fondamentale nell'omeostasi di NO nel sangue dei pesci e nel muscolo cardiaco. Per comprendere il ruolo di Xgb e Cygb1 nella rigenerazione cardiaca, utilizzando CRISPR / Cas9, abbiamo generato mutanti *knock-out* di zebrafish da utilizzare per comprendere la funzione di Xgb e Cygb1. Abbiamo scoperto che Xgb, la globina più ancestrale, è un potente enzima che riduce il nitrito a NO e mostra potenti proprietà anticoagulanti sulle piastrine umane. Stiamo ora investigando il ruolo di Xgb nel sangue durante la rigenerazione del cuore di zebrafish. Cygb1 è una globina che può mediare la risposta rigenerativa cardiaca al nitrito. Abbiamo studiato l'espressione della citoglobina nel cuore dello zebrafish mediante l'ibridazione *in situ* e l'immunohistochimica.

Nitrite dose response effects on scar size and cardiomyocyte proliferation following cryoinjury. A. Levels of nitrite were measured using a nitric oxide analyzer (NOA). While there is almost no detectable nitrite in the water (0.14 µM), the endogenous nitrite concentration in the uninjured heart and in the amputated heart is 3.69 ± 0.43 µM and 2.82 ± 1.32 µM respectively. Following cryoinjury the injury size (B) and number of proliferating cardiomyocytes (C) were measured comparing hypoxia, hypoxia (hyp) + 10 µM nitrite, hyp + 30 µM nitrite, and hyp + 60 µM nitrite. The 10 µM nitrite dose significantly decreased both the scar size and increased the number of proliferating cardiomyocytes at 5 days post cryoinjury (dpc). Student's t-test: \*P<0.05, \*\*P<0.01. Data are expressed as mean ± SEM. D Schematic of amputation and cryoinjury heart regeneration models. Following fixation, cryosection and AFOG staining, scar measurements were calculated differently for each model. In amputated hearts the total uninjured area per the total ventricular area was calculated. In cryoinjured hearts the total injured area over the total ventricular area was calculated. V: ventricle, A: atrium, BA: bulbous arteriosus.

I nostri dati mostrano che Cygb1 è espressa nell'epicardio e la sua espressione è aumentata in seguito a danno cardiaco. Cygb1 può mediare questa risposta nel suo stato di ridotta attraverso la sua rapidità di reazione ed efficienza come enzima nitrito-reduttasi (rate: 28.6 ± 3.1 M<sup>-1</sup>s<sup>-1</sup>) oppure quando ossidata (P50 per l'ossigeno è 0,277 torr) Cygb1 può reagire con il nitrito per produrre radicali liberi (RNS/ROS), modulando la risposta immunitaria tramite segnalazione ROS/RNS. Questo progetto di ricerca si è aggiudicato il "AHA Career Development Award" - PI: Paola Corti. (2018-2021).

## OBIETTIVI PER IL 2019

Altre globine come la neuroglobina, la mioglobina e la citoglobina 2 sono espresse in vari tessuti e hanno funzioni non identificate. Oltre alla loro capacità di legare l'ossigeno e agire come trasportatori di ossigeno, la loro funzione fisiologica è oggi incerta sulla base di nuove evidenze recentemente descritte in letteratura. Il nostro obiettivo è comprendere la funzione *in vivo* delle globine, come neuroglobina, citoglobina 1, citoglobina 2, globina X e mioglobina. Genereremo linee mutanti stabili usando tecniche di ingegneria genetica CRISPR/Cas9 per tutte queste globine e condurremo esperimenti sulla rigenerazione cardiaca e sullo sviluppo embrionale usando questi mutanti. Utilizzando una combinazione di strumenti, tra cui linee transgeniche e colture di cardiomiociti, testeremo la capacità delle globine di ridurre il nitrito a ossido nitrico e determineremo le conseguenze sul processo di rigenerazione cardiaca e sullo sviluppo embrionale. Verificheremo anche il possibile contributo del nitrito alla generazione di ROS/RNS da parte delle globine ossidate e studieremo l'effetto sulla risposta del sistema immunitario. Il nitrito è un composto non tossico a basse dosi, facilmente reperibile e recentemente scoperto essere citoprotettivo in ambiente ipossico/ischemico. Capire come possiamo modulare questi meccanismi protettivi e possibilmente migliorare la rigenerazione cardiaca in presenza di nitriti e in base alla funzione delle globine sarà di grande importanza per le applicazioni terapeutiche.

## CONFERENZE

**Poster**  
13 ° Conferenza internazionale di Zebrafish, giugno 2018. Rochon E, Xue J, Tejero J, Gladwin M e Corti P. Nitrite improves zebrafish cardiac regeneration potentially mediated by Cytooglobin 1, Madison WI (USA).

American Heart Association Conference, novembre 2018. Rochon E, Xue J, Corti P e Gladwin M. Nitrite treatment in hypoxia improves zebrafish cardiac and fin regeneration, Chicago IL (USA).

**Conferenza**  
O2BiP Oxygen Binding Protein, 3-6 settembre 2018. Paola Corti. Seminario per invito. Nitrite improves zebrafish cardiac regeneration potentially mediated by Cytooglobin 1, Barcellona (Spagna).

PRODOTTI: FARMACI BIOLOGICI

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

Bruno Douradinho, PhD  
bdouradinho@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 competerebbero anche con *K. pneumoniae* per l'adesione a cellule e superfici mucose, 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.

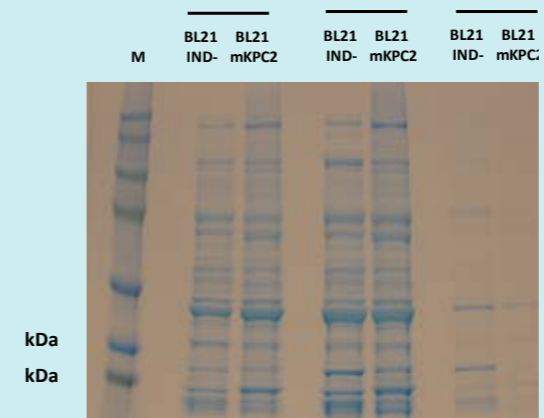
Ad oggi, nessun vaccino è disponibile contro *K. pneumoniae*. Riteniamo che i ceppi probiotici di *S. cerevisiae* possano rappresentare una strategia di immunizzazione ideale contro i patogeni che richiedono una risposta immunitaria a livello della mucosa per prevenire infezioni, ad esempio, batteri 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 la competizione per il legame con i recettori cellulari usati da *K. pneumoniae* a formare biofilm sulle cellule intestinali 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, inducono una risposta immunitaria.

## RISULTATI RAGGIUNTI NEL 2018

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*.



Abbiamo clonato otto proteine batteriche, la maggior parte delle quali proteine di membrana, che sono i migliori antigeni. Le proteine clonate erano le proteine delle fimbrie MrkA, MrkD, fimA e fimH, KPC-2, O1507, O1508 e cuxinasi. Tuttavia, tutte le proteine tranne KPC-2 erano insolubili, anche quando co-espresse con il tag GST, che di solito rende solubili le proteine.

La purificazione KPC-2, d'altra parte, portava sempre ad un estratto sporco, cioè non siamo mai stati in grado di ottenere una proteina pura e pulita priva di altri detriti cellulari. Pertanto, abbiamo abbandonato la strategia delle proteine ricombinanti e abbiamo iniziato a concentrarci sul protocollo del lievito ricombinante.

## OBIETTIVI PER IL 2019

I nostri obiettivi per il 2019 sono di clonare le proteine summenzionate in *S. cerevisiae*, ottenendo così ceppi geneticamente modificati che esprimono, sulla loro superficie, quelle proteine. Una volta disponibili, valuteremo i loro livelli di espressione mediante tecniche di immunogenicità di routine, come la citometria a flusso e *Western blot*, per verificare se le proteine prodotte dal lievito sono riconosciute dagli anticorpi presenti nei sieri di pazienti che hanno sofferto di infezione da *K. pneumoniae*. Osserveremo anche se i lieviti ricombinanti hanno il potenziale per interferire con i comuni tratti batterici, come la formazione di biofilm abiotici e prove di adesione cellulare e di adesione. Questi test ci permetteranno di avere un'idea del potenziale delle *S. cerevisiae* ricombinanti che esprimono *K. pneumoniae* per imitare le funzioni batteriche, che potrebbero riflettersi in un profilo immunogenico.

## CONFERENZE

28th European Congress of Clinical Microbiology and Infectious Diseases, April, 2018, Madrid (Spagna).  
Ri.MED Research Retreat, October, 2018, Palermo (Italia).

## PUBBLICAZIONI

Di Mento G, Cuscino N, Carcione C, Cardinale F, Conaldi PG e Douradinho B. (2018). Emergence of a *Klebsiella pneumoniae* ST392 clone harbouring KPC-3 in an Italian transplantation hospital. *Journal of Hospital Infection*, 98(3), 313-314. doi: 10.1016/j.jhin.2017.11.019.

Purification of carbapenemase KPC-2 expressed in *E. coli*

PRODOTTI: FARMACI BIOLOGICI

# Sviluppo di un vaccino contro l'HIV basato su ceppi di *S. cerevisiae* geneticamente modificati

Bruno Douradina, PhD  
bdouradina@fondazionerimed.com

 **COLLABORAZIONI**  
Università di Pittsburgh (Pitt), Pittsburgh, U.S.A.

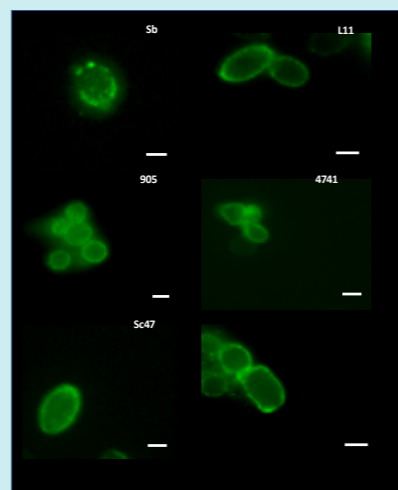
 **AREA TERAPEUTICA**  
Malattie infettive

## PIPELINE



## BREVE DESCRIZIONE

Finora, nessun vaccino è disponibile contro l'HIV. L'uso di ceppi di *S. cerevisiae* geneticamente modificati che esprimono l'antigene HIV GAG ha indotto una potente risposta immunitaria cellulare nei topi. Tuttavia, una risposta contro l'HIV deve suscitare sia i bracci cellulari e umorali del sistema immunitario che una risposta immunitaria della mucosa, poiché questo virus può essere trasmesso sessualmente attraverso le superfici della mucosa. Mentre i ceppi di *S. cerevisiae* laboratoriali conferiscono una debole risposta immunitaria nella mucosa, i loro equivalenti probiotici inducono una potente secrezione di sigA nel colon e hanno proprietà immunomodulatorie. È interessante notare che diversi ceppi di *S. cerevisiae* probiotici riescono ad indurre diversi tipi di risposta immunitaria. In questo lavoro, abbiamo geneticamente modificato ceppi probiotici di *S. cerevisiae* per esprimere nella loro superficie l'antigene dell'HIV Gag da utilizzare ulteriormente come approccio di vaccinazione contro questo agente patogeno virale.



Genetically engineered *S. cerevisiae* strains express HIV Gag antigen. Expression of HIV Gag was determined by immunofluorescence and it was observed only in pJRP-transformed strains. Bar 10  $\mu$ m.

## IMPATTO

Sono ancora necessari nuovi approcci per un vaccino contro l'HIV. Poiché la principale via di infezione dell'HIV-1 avviene attraverso le superfici della mucosa, la corretta eliminazione dell'HIV-1 richiede l'attivazione immunitaria delle risposte sia umorali che mucose, oltre all'immunità cellulare.

I nostri risultati hanno mostrato che i lieviti fagocitati da cellule dendritiche umane (DC) erano in grado di indurre la maturazione di queste cellule immunitarie e la loro polarizzazione in una risposta immunitaria di tipo 1. Solo i ceppi probiotici che esprimono Gag sull'HIV erano in grado di indurre una risposta immunitaria specifica delle cellule T contro l'HIV Gag *in vitro*, usando DC e cellule T derivate da un donatore di HIV-1+. Siamo convinti che i nostri risultati rivelino il potenziale dei ceppi probiotici di *S. cerevisiae* geneticamente modificati come nuovi vettori di vaccinazione contro l'HIV.

Questo approccio ha anche il vantaggio di utilizzare questi lieviti nella loro forma liofilizzata, che sarebbe un'eccellente alternativa nei paesi in via di sviluppo privi di strutture con accesso inaffidabile alle apparecchiature di stoccaggio refrigerate.

## RISULTATI RAGGIUNTI NEL 2018

Nel corso di quest'anno, abbiamo confermato che i lieviti geneticamente modificati che esprimono l'antigene virale dell'HIV Gag stavano decisamente polarizzando le DC umane in una risposta immunitaria di tipo 1, come dimostrato dall'espressione superficiale di Siglec-1.

L'attivazione e la maturazione dei lieviti è stata dimostrata sia dall'espressione delle molecole di superficie CD86, CD83 e CCR7,

sia da un aumento dei livelli di IFN- $\gamma$ , IL-10, IL-12p70, IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-8 e TNF- $\alpha$  sono stati osservati nel terreno di crescita. Questo dato rafforza l'ipotesi che questi lieviti probiotici di *S. cerevisiae* geneticamente modificati siano una potenziale strategia di vaccinazione contro l'HIV a causa delle loro comprovate capacità immunomodulatorie, insieme ai risultati ottenuti prima *in vitro* ed *ex vivo* usando le DC di un paziente HIV+.

## OBIETTIVI PER IL 2019

I nostri obiettivi per 2019 sono, compatibilmente con i fondi disponibili, ripetere questi esperimenti usando DC di più pazienti HIV+ per confermare i risultati precedenti.

Abbiamo anche in programma di utilizzare topi umanizzati che consentono la replicazione dell'HIV e quindi sarebbe un buon modello per studiare non solo il potenziale immunogenico di questa strategia di vaccinazione ma anche per valutare i suoi livelli di protezione, immunizzando topi con i lieviti e poi facendoli il challenge con l'HIV.

Con questo modello, possiamo studiare quali popolazioni cellulari vengono attivate durante l'immunizzazione con le *S. cerevisiae* probiotiche, così come indurre un'immunità di mucosa e valutare i suoi effetti su un challenge della mucosa con l'HIV. Questo modello animale fornirà informazioni utili che possono essere cruciali per decidere se dobbiamo passare a studi clinici che coinvolgono volontari umani.

## CONFERENZE

12th Vaccine Elsevier Congress, September, 2018, Budapest (Ungheria).

## PROPRIETÀ INTELLETTUALE

Domanda di brevetto n. WO/2018/091637, 24/05/2018, Probiotic yeasts as novel vaccination vectors.

# Sorveglianza e caratterizzazione di ceppi batterici multiresistenti di rilevanza clinica

Bruno Douradina, PhD  
bdouradina@fondazionerimed.com

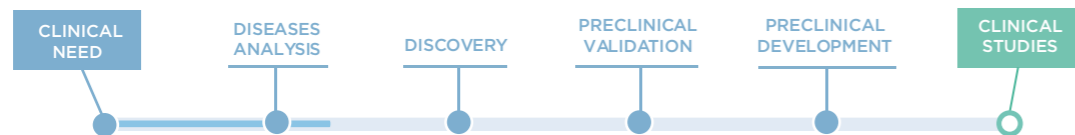
## COLLABORAZIONI

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.

K. pneumoniae isolates with a particular carbapenemase gene								
genes <sup>a</sup>	2011	2012	2013	2014	2015	2016	2017	Total
<i>bla<sub>CTX-M-15</sub></i>	-	3	8	6	5	10	4	36
<i>bla<sub>KPC-3</sub></i>	4	16	18	15	22	22	28	125
<i>bla<sub>OXA-1</sub></i>	-	-	-	9	4	8	10	31
<i>bla<sub>OXA-48</sub></i>	-	-	-	-	-	-	1	1
<i>bla<sub>SHV-1</sub></i>	-	-	1	1	-	1	1	4
<i>bla<sub>SHV-11</sub></i>	4	13	9	6	15	13	26	86
<i>bla<sub>SHV-27</sub></i>	-	-	1	-	1	-	-	2
<i>bla<sub>SHV-28</sub></i>	-	2	7	2	3	9	2	25
<i>bla<sub>SHV-38</sub></i>	-	-	-	-	-	1	-	1
<i>bla<sub>SHV-76</sub></i>	-	-	-	3	-	-	-	3
<i>bla<sub>T2M-1</sub></i>	-	3	10	11	9	14	4	51

## RISULTATI RAGGIUNTI NEL 2018

Durante quest'anno, abbiamo valutato e caratterizzato in modo retrospettivo lo scenario epidemiologico dal 2011 al 2017 di ceppi di *Klebsiella pneumoniae* resistenti ai carbapenemi presso IRCCS-ISMETT. Sono stati isolati cento sessantuno ceppi resistenti ai carbapenemi dai pazienti e il loro materiale genetico sottoposto al Next Generation Sequencing, per determinare la loro origine, lo ST e rilevare la presenza di potenziali geni di resistenza e virulenza. Abbiamo osservato che la stragrande maggioranza dei ceppi resistenti erano *K. pneumoniae* (86,3%), quasi tutti produttori di KPC (99,3%). In accordo con l'attuale scenario epidemiologico italiano, abbiamo identificato ceppi di ST512 clade II, ST258, ST101 e ST307, ma anche di ST non precedentemente osservati in altre strutture sanitarie italiane, come ST392. È stata rilevata anche la presenza di geni carbapenemasi coinvolti nella resistenza, come *bla<sub>KPC-3</sub>*, *bla<sub>OXA-1</sub>*, tra altri. Il nostro lavoro evidenzia che i geni di resistenza si stanno rapidamente diffondendo tra diversi e nuovi cloni di *K. pneumoniae* che, combinati con la resistenza a più antibiotici, possono derivare in ceppi multiresistenti di importanza clinica più aggressivi. I nostri risultati sottolineano l'importanza della sorveglianza continua di Enterobacteriaceae resistenti ai carbapenemi nelle strutture sanitarie in modo che possano essere identificati rapidamente nuovi ST portatori di geni di resistenza che possono diventare sempre più patogeni.

## OBIETTIVI PER IL 2019

I nostri obiettivi per il 2019 sono di terminare e pubblicare i dati di sorveglianza retrospettiva descritti sopra, sequenziando più isolati clinici da entrambi i casi di colonizzazione e infezione dal 2008 al 2011. Il 2008 è stato l'anno in cui un primo *K. pneumoniae* resistente ai carbapenemasi è stato identificato presso l'IRCCS-ISMETT. Intendiamo fornire una panoramica completa dei ceppi KPC presenti nel nostro partner clinico dal 2008 al 2017 e capire quali seguivano le tendenze epidemiologiche nazionali e internazionali e quali, come ST392, erano casi particolari identificati proprio all'IRCCS-ISMETT. Parallelamente, inoltre, in stretta collaborazione con l'unità di diagnostica IRCCS-ISMETT, caratterizzeremo eventuali nuovi potenziali casi di infezione che potrebbero verificarsi, come una recente identificazione di *Mycobacterium saskatchewanense*, un micobatterio non tubercolare finora isolato solo in Nord America.

## CONFERENZE

- 28th European Congress of Clinical Microbiology and Infectious Diseases, April, 2018, Madrid (Spagna).  
- Ri.MED Research Retreat, October, 2018, Palermo (Italia).

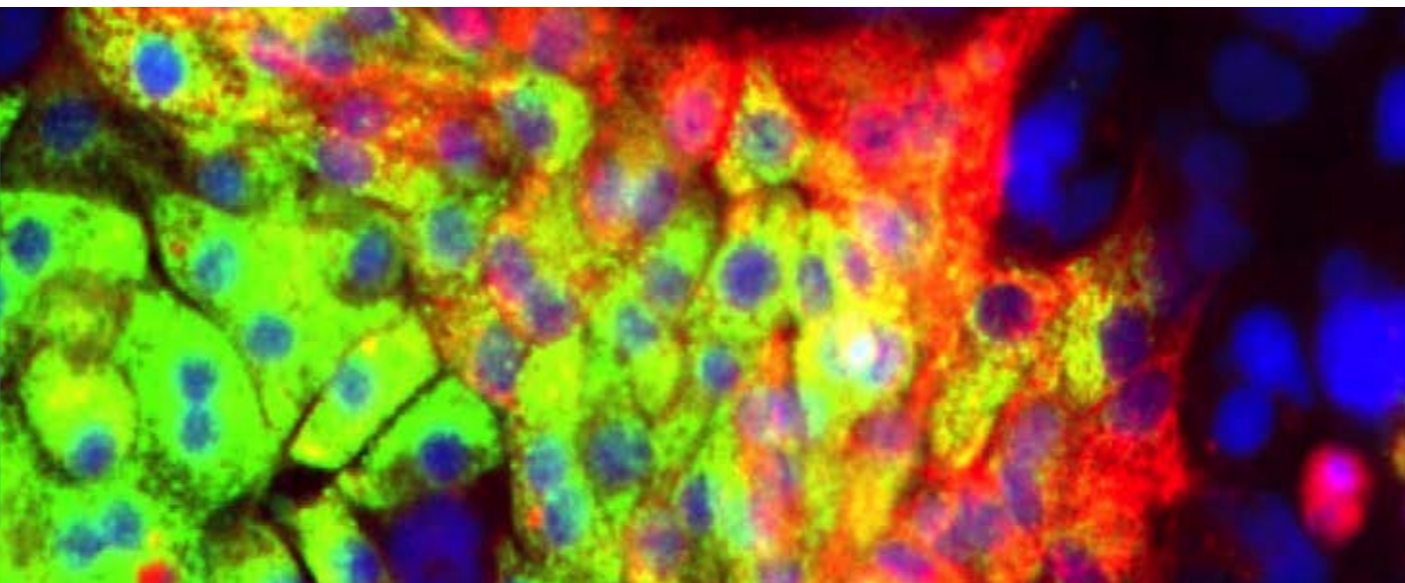
## PUBBLICAZIONI

Di Mento G, Cuscino N, Carcione C, Cardinale F, Conaldi PG e Douradina B. (2018). Emergence of a *Klebsiella pneumoniae* ST392 clone harbouring KPC-3 in an Italian transplantation hospital. *Journal of Hospital Infection*, 98(3), 313-314. doi: 10.1016/j.jhin.2017.11.019.

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

# Rigenerazione di un fegato in sedi ectopiche

Maria Giovanna Francipane, PhD  
mgfrancipane@fondazionerimed.com



## COLLABORAZIONI

LyGenesis, Inc., Pittsburgh, U.S.A.  
Mayo Clinic, Rochester, Minnesota, U.S.A.

## AREA TERAPEUTICA

Insufficienze d'organo

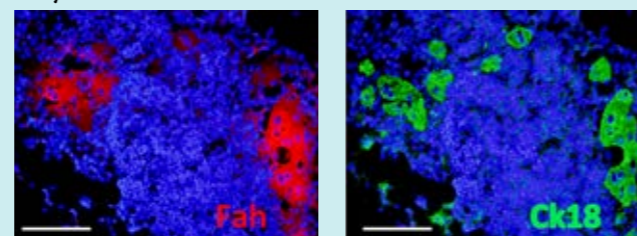
## PIPELINE



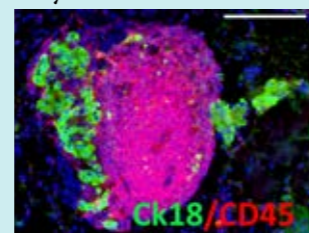
## BREVE DESCRIZIONE

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 con una piattaforma tecnologica sulla rigenerazione d'organo, che consente di utilizzare i linfonodi (LN) del paziente come bioreattori per la rigenerazione di organi ectopici funzionanti. Il programma preclinico principale di LyGenesis è focalizzato sulla rigenerazione epatica in pazienti con malattia epatica allo stadio terminale. L'iniezione di cellule epatiche nei LN di topi affetti da malattia epatica ha dato origine a mini-fegati funzionanti in grado di ripristinare la funzionalità epatica mancante. Studi preclinici nei maiali sono stati incoraggianti e LyGenesis è adesso in discussione con la Food and Drug Administration (FDA) americana per completare l'IND (Investigational New Drug), necessario per iniziare il trial clinico sull'uomo. Altri target terapeutici includono il timo, il pancreas ed il rene.

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<sup>-/-</sup>. Dopo due giorni, alcuni epatociti Fah<sup>+</sup>CK18<sup>+</sup> sono localizzati nel sistema linfatico vicino ai linfociti. Dopo tre giorni, gruppi di epatociti CK18<sup>+</sup> vengono osservati in associazione con cellule ematopoietiche CD45<sup>+</sup>.

## 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 cellulare potrebbero fornire un ambiente più idoneo all'attecchimento e proliferazione degli epatociti. I LN rappresentano un sito alternativo promettente grazie a numerose caratteristiche. A seconda dello stadio della malattia, la rigenerazione di un fegato all'interno dei LN 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 consente di trattare dozzine di pazienti con un solo organo. Invece di una chirurgia invasiva, LyGenesis usa l'endoscopia ambulatoriale per trapiantare le cellule epatiche, che crescono e diventano un organo funzionante.

## RISULTATI RAGGIUNTI NEL 2018

**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 ectopici 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. Identificare i meccanismi molecolari e cellulari che permettono lo sviluppo di un fegato ectopico negli aFALCs è in nostro obiettivo attuale.

**MAIALE:** Maiali carenti dell'enzima FAH hanno ricevuto il trapianto autologo di epatociti nei LN dopo trasduzione con un vettore lentivirale esprime 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:** Il cane è stato scelto come modello animale preclinico per esplorare la sicurezza e la tollerabilità dell'approccio terapeutico basato sull'uso del LN. Tutto il laboratorio è stato formato per l'isolamento di epatociti di grado clinico, in stretto regime GMP (good manufacturing practice). Il primo cane ha ricevuto il trapianto di epatociti nei LN attraverso endoscopia a metà dicembre. Il cane è sopravvissuto all'intervento, dimostrando la sicurezza della procedura. Inoltre, quando i LN sono stati isolati ed analizzati, sono stati identificati epatociti attecchiti.

## OBIETTIVI PER IL 2019

Il laboratorio Lagasse e LyGenesis completeranno lo studio sul cane e richiederanno un IND all'FDA. Anche i programmi sul timo inizieranno. Dati preliminari nel laboratorio supportano l'idea che il trapianto di timo nel LN potrebbe ringiovanire il sistema immunitario e in questo modo prevenire malattie correlate all'invecchiamento.

## PUBBLICAZIONI

Nicolas CT, Hickey RD, Allen KL, Du Z, Guthman RM, VanLith CJ, 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. *Sottomesso*.

Han B, Francipane MG, Cheikhi A, Lagasse E. Ectopic Liver Development in Abdominal Fat-associated Lymphoid Clusters (aFALCs). *In preparazione*.



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

# Rigenerazione di un rene in sedi ectopiche

**Maria Giovanna Francipane, PhD**  
mgfrancipane@fondazionerimed.com

## COLLABORAZIONI

Children's Hospital of Pittsburgh of UPMC, Pittsburgh, PA, U.S.A.  
Maine Medical Center Research Institute, Scarborough, ME, U.S.A.  
University of Southern California, Los Angeles, CA, U.S.A.

## AREA TERAPEUTICA

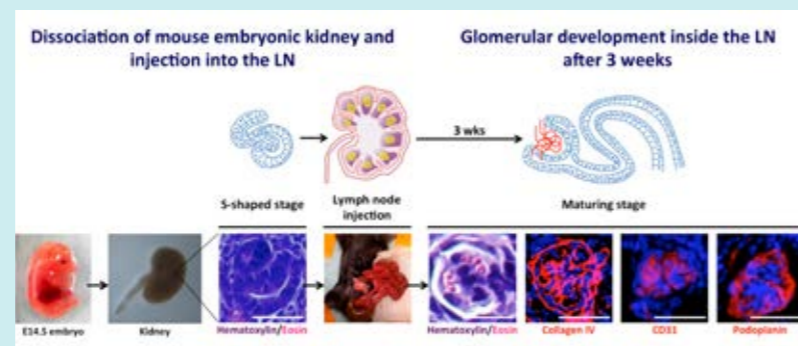
Insufficienze d'organo

## PIPELINE



## BREVE DESCRIZIONE

Le malattie renali hanno un impatto negativo sulla salute umana in tutto il mondo, e le previsioni non sono confortanti, suggerendo la necessità di esplorare nuovi approcci terapeutici in grado di superare i limiti associati agli interventi tradizionali. La dialisi, il metodo più diffuso per trattare l'insufficienza renale, può solo supplire al 10-20% della funzionalità renale. Viceversa, il trapianto è in grado di offrire una qualità di vita migliore e una sopravvivenza più lunga, ma spesso non è fattibile a causa dalla carenza di organi. L'efficacia degli *scaffold* renali decellularizzati e ripopolati con cellule specifiche per il trattamento dei pazienti con insufficienza renale non è stata ancora dimostrata.



**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.

## 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 2018

Poiché lo sviluppo e l'omeostasi del LN richiedono l'attivazione della via di trasduzione del segnale mediata dal recettore della linfotossina beta (LTβR) nel compartimento delle cellule stromali, abbiamo ipotizzato che questa via modulasse anche l'angiogenesi dei tessuti renali trapiantati nel LN.

La terapia cellulare con cellule staminali ha dimostrato efficacia nei modelli animali, ma non è traslabile nella pratica clinica, a causa dell'infiammazione, fibrosi e tessuto cicatriziale che ostruiscono il flusso sanguigno nei reni danneggiati e generano un ambiente avverso all'attecchimento delle cellule trapiantate. 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.

Per confermare questa ipotesi, abbiamo trattato i topi trapiantati con i tessuti renali nei loro LN con la proteina di fusione ricombinante LTβR-Fc, che antagonizza gli effetti mediati da LTβR interagendo con i suoi ligandi. Abbiamo anche utilizzato topi *knockout* per LTβR (LTβR<sup>-/-</sup>) come recipienti dei trapianti. Poiché questi topi non hanno LN, abbiamo usato l'omento come sito alternativo di trapianto. In entrambi i siti, l'inibizione della via di trasduzione del segnale mediata LTβR ha causato una riduzione dell'angiogenesi e dell'espansione negli impianti. L'uso di topi deficienti per la chinasi NIK, che media la via di trasduzione non canonica di NF-κB a valle di LTβR, ha indicato che l'attivazione di NIK non è necessaria per gli effetti mediati da LTβR durante lo sviluppo del rene ectopico. Inoltre, i nostri dati indicano che LTβR partecipa anche alle risposte adattive alla riduzione della massa renale, indicando un ampio ruolo per LTβR nella rigenerazione renale.

Nel complesso, il nostro studio indica che sia nel LN che nell'omento, la via di trasduzione del segnale mediata da LTβR genera segnali angiogenici per supportare l'organogenesi renale.

## OBIETTIVI PER IL 2019

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 cellulare-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

- 2nd Annual Summit on Stem Cell Research, Cell & Gene Therapy: Bridging the Gap from Basic Cell Science to Advanced Cellular Therapies for a Better Life, Novembre, 2018, Atlanta, GA, USA.
- ISSCR Annual Meeting, Giugno, 2018, Melbourne, Australia
- Ri.MED Research Retreat, Ottobre, 2018, Palermo, Italia.

## PUBBLICAZIONI

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. *Sottomesso*.

M. G. Francipane, B. Han and E. Lagasse. Host lymphotoxin-beta receptor signaling is crucial for angiogenesis of metanephric tissue transplanted into lymph nodes and omenta. *Sottomesso*.

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



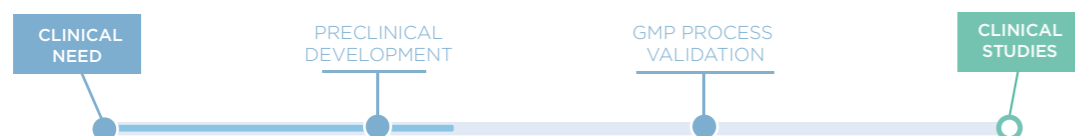
 **COLLABORAZIONI**  
IRCCS - ISMETT, Palermo, Italia

 **AREA TERAPEUTICA**  
Insufficienze d'organo

 **IMPATTO**

 **OBIETTIVI PER IL 2019**

## PIPELINE



## 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 terapia 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.

La creazione di una banca di linfociti T multi-virus specifici eterologhi rappresenta il nostro obiettivo finale perché garantirebbe la disponibilità di un prodotto "pronto all'uso". Quindi cellule T derivate da un donatore sano da somministrare ad un paziente, HLA compatibile, al momento della diagnosi di complicanze post-trapianto virus-relate.

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 2018

La fase iniziale dello studio, partito nel 2018, è stata incentrata nella raccolta e valutazione delle fonti cellulari più idonee alla creazione di una banca di linfociti T multi-virus specifici. A questo scopo è stata analizzata la resa e la vitalità delle cellule provenienti sia da sangue di donatori sani sia da sangue cordonale. Al fine di ottimizzare i protocolli di produzione dei cloni T multi virus-specifici,

nella seconda fase abbiamo valutato diversi approcci sperimentali testando: a) differenti tipi di cellule capaci di presentare gli antigeni virali (cellule dendritiche, cellule B e monociti); b) l'aggiunta nel mezzo di coltura di combinazioni di diverse interleuchine per favorire il priming e la proliferazione cellulare. Per valutare i diversi protocolli i linfociti T prodotti sono stati caratterizzati, a differenti *time points*, dal punto di vista immunofenotipico. Inoltre è stata saggiata l'attività citotossica virus specifica *in vitro* e analizzato il rilascio nel mezzo di coltura di alcune molecole fondamentali per il mantenimento della risposta cellulo-mediata *in vivo* (es. IFN- $\gamma$ ) e la proliferazione cellulare. I dati sperimentali preliminari sono incoraggianti perché indicano la fattibilità nel generare linfociti T multi-virus specifici da entrambe le fonti cellulari testate, ma in maniera più efficiente dalle cellule del sangue da donatore adulto rispetto a quelle da sangue cordonale. Inoltre, il protocollo da noi definito "rapido", che non prevede l'ausilio di cellule professionali quali le cellule dendritiche, è quello che ha mostrato una migliore efficacia *in vitro* in termini di potenza e specificità.

Lo scopo principale sarà produrre i linfociti T multivirus specifici seguendo le linee guida Buone Pratiche di Fabbricazione o GMP (*Good Manufacturing Practice*) che devono essere applicate in quanto il nostro prodotto è un ATMP. Attività del prossimo futuro:

- Definire la fonte cellulare e il protocollo di produzione più idoneo, aumentando il numero di lotti prodotti per confermare i dati sperimentali finora ottenuti.
- Effettuare la convalida del processo e dei controlli di qualità per definire i test di purezza, potenza/specificità del prodotto per terapia cellulare.

## PUBBLICAZIONI

Gallo A, Miele M, Badami E, Conaldi PG. "Molecular and cellular interplay in virus-induced tumors in solid organ recipients." *Cell Immunol.* 2018 Feb 16. <https://doi.org/10.1016/j.cellimm.2018.02.010>



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

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

Mariangela Pampalone  
mpampalone@fondazionerimed.com

 **COLLABORAZIONI**  
IRCCS - ISMETT Palermo, Italia

 **AREA TERAPEUTICA**  
Insufficienze d'organo

### 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 dalle cellule del *Kupffer*, che sono fonte di specie altamente reattive dell'O<sub>2</sub> 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, facilita l'attecchimento di infezioni nelle varie sedi, incluso il liquido ascitico.

### IMPATTO

Nei pazienti con cirrosi avanzata, la traslocazione del DNA-batterico induce l'attivazione del sistema del complemento sia nel plasma che nel liquido ascitico e attiva l'immuno-risposta cellulo-mediata e l'iperproduzione di ossido nitrico da parte dei macrofagi peritoneali con una più alta produzione delle citochine pro- infiammatorie (IL-6 e TNF- $\alpha$ ). I macrofagi, cellule dell'immunità innata, rappresentano la prima linea di difesa contro i microbi e potrebbero essere utilizzati come target per il trattamento di asciti in condizioni basali e in presenza di sovra infezione.

È possibile valutare l'attività dei macrofagi in termini di attivazione e di secrezione di citochine pro ed anti infiammatorie in assenza o in presenza di cellule mesenchimali o epiteliali nel fluido ascitico e nel sangue periferico di pazienti cirrotici (Child-Turcotte-Pugh B e C) in presenza di diversi gradi di infezione batterica.

### RISULTATI RAGGIUNTI NEL 2018

Sono stati condotti degli esperimenti preliminari per valutare l'effetto del liquido ascitico sulle cellule mesenchimali ed epiteliali a diversi tempi. I risultati ottenuti hanno dimostrato che entrambi i tipi cellulari a contatto con il fluido ascitico non presentano variazioni morfologiche, inibizioni alla proliferazione, variazioni fenotipiche né valori di necrosi/apoptosi significativi.

È stata inoltre determinata la componente leucocitaria dell'ascite proveniente da 12 pazienti. La componente dominante del fluido rappresentata da monociti (con una più bassa percentuale di Linfociti B e cellule NK) è stata

caratterizzata in termini di espressione di *markers* di attivazione (HLADR, TLR4) in assenza o in co-cultura con cellule mesenchimali ed epiteliali derivanti da *amnion* placentare a diversi tempi.

### OBIETTIVI PER IL 2019

Studio dei mezzi condizionati prodotti dalle cellule in co-cultura con la componente monocitica isolata dal fluido ascitico di pazienti cirrotici per la valutazione dell'espressione di citochine pro ed anti infiammatorie secrete.

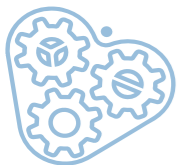
Valutazione carica batterica del fluido ascitico prima e dopo co-cultura dei campioni con hMSCs/hAECs con analisi di espressione *markers* di attivazione e capacità fagocitica dei macrofagi.

Ottimizzazione del protocollo di estrazione delle cellule mesenchimali ed epiteliali da *amnion* di placenta umana per sviluppo di ATMP.

### PUBBLICAZIONI

Miceli V, Pampalone M, Frazziano G, Grasso G, Rizzarelli E, Ricordi C, Casu A, Iannolo G, Conaldi PG  
"Carnosine protects pancreatic beta cells and islets against oxidative stress damage" *Mol Cell Endocrinol.* 474: 105-118 (2018)





# INGEGNERIA DEI TESSUTI E DISPOSITIVI BIOMEDICALI

Il team di Bioingegneria della Fondazione Ri.MED è composto da ingegneri, biologi, chimici e farmacologi che lavorano in stretta collaborazione con medici e chirurghi. Il focus delle ricerche è lo studio dei biomateriali e dei tessuti ingegnerizzati, la loro caratterizzazione reologico-meccanica e lo sviluppo di dispositivi clinici su questi basati.

Ri.MED ha realizzato una piattaforma basata su strumenti (fisici e computazionali) e attrezzature essenziali per la conduzione delle simulazioni numeriche e dei test sperimentali per la verifica e qualificazione delle prestazioni strutturali e fluidodinamiche delle soluzioni cliniche sviluppate, in accordo con le normative richieste per la certificazione CE e l'approvazione FDA.

La piattaforma permette l'ottimizzazione di tessuti ingegnerizzati per le diverse applicazioni, in particolare nell'ambito cardiovascolare, grazie a una migliore comprensione dell'effetto degli stimoli fluido-meccanici e strutturali sulla differenziazione e proliferazione cellulare. La piattaforma consente inoltre l'impiego dei tessuti ingegnerizzati nella progettazione, nello sviluppo e nella validazione preclinica di organi e componenti cardiovascolari impiantabili di nuova generazione. 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 trattamenti *patient-specific* 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

## Predizione del potenziale di lesioni ischemiche a seguito di terapie cardio-valvolari

Gaetano Burriesci, PhD

## Simulazione in vitro di terapie della valvola mitrale

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

## Modelli osteocondrali 3D per lo studio di patologie degenerative e terapie in microgravità

Riccardo Gottardi, PhD

## R-CaRe - Riabilitazione per la rigenerazione della cartilagine

Riccardo Gottardi, PhD

## Modellazione in-silico per la stratificazione del rischio clinico di patologie cardiovascolari

Salvatore Pasta, PhD



# Sviluppo di bio-adesivi per ambienti acquosi

Caterina Alfano, PhD  
calfano@fondazionerimed.com



## COLLABORAZIONI

Istituto di Biofisica (IBF) - CNR, Palermo, Italia  
Department of Basic and Clinical Neuroscience - King's College London, Londra, Regno Unito  
Dipartimento di Farmacia, Università degli Studi di Salerno, Salerno, Italia

## PIPELINE



## BREVE DESCRIZIONE

Gli animali sessili marini hanno sviluppato strategie adattative per superare gli ostacoli che inibiscono la loro adesione in acqua (pH, strati di idratazione e proprietà dielettriche). Ciò ha reso questi animali potenziali fonti di bio-adesivi non tossici applicabili in ambienti acquosi. Queste proprietà di forte adesione e insolubilità in acqua hanno suscitato un interesse crescente per potenziali applicazioni in medicina rigenerativa, biotecnologia e scienza dei materiali. In particolare, le cozze hanno ricevuto un'attenzione significativa soprattutto per la loro capacità di aderire fortemente ai loro substrati anche in condizioni di marea turbolenta.

L'adesione di tali organismi è possibile grazie alla secrezione di un *holdfast* (bisso) costituito da proteine sintetizzate nel cosiddetto piede della cozza. In particolare, nel genere *Mytilus* sono state identificate sei proteine secrete dal piede (*mussel foot proteins, mfp*): mfp-2, -3S, -3F, -4, -5 e -6. L'ipotesi ad oggi più supportata attribuisce le proprietà adesive di tali proteine principalmente grazie ad una modificazione post-traduzionale che consiste nell'idrossilazione enzimatica dei residui di tirosina in 3,4-diidrossifenil-L-alanina (DOPA). Tuttavia, mancano ancora conferme certe di questa ipotesi a causa dell'insufficiente caratterizzazione delle proteine coinvolte, specialmente nella loro forma non modificata in DOPA.



## IMPATTO

Negli ultimi anni vi è un interesse crescente nello sviluppo di nuovi adesivi di derivazione naturale in diverse aree delle applicazioni cliniche come l'ingegneria dei tessuti, l'impianto di dispositivi medici e la chiusura di ferite. Esistono, infatti, situazioni in cui altre tecniche come la sutura sono impraticabili e l'uso di adesivi per tessuti diventa particolarmente cruciale. La grande sfida nello sviluppo di nuove molecole bio-adesive consiste nel trovare molecole in grado di lavorare in ambienti umidi e ostili e in grado di far aderire i tessuti in modo efficiente in tali condizioni. Proteine bio-ispirate da animali sessili con proprietà adesive in acqua, potrebbero superare queste difficoltà. Tale proteine presentano inoltre proprietà interessanti quali quella di essere biodegradabili, di essere solitamente non tossiche per il corpo umano e di non suscitare facilmente una forte risposta immunitaria.



## RISULTATI RAGGIUNTI NEL 2018

Tre mfp sono state recentemente identificate nella cozza verde asiatica *Perna viridis*: Pvfp-3a, Pvfp-5β e Pvfp-6. Secrezioni adesive di tali proteine indotte da soluzione salina iniettata nel piede del mitilo hanno mostrato che, tra le tre varianti, la proteina Pvfp-5β viene secreta per prima e si è quindi ipotizzato che questa proteina sia la prima ad avviare l'interazione con il substrato. Per tale ragione, durante quest'anno ci siamo focalizzati su Pvfp-5β ed abbiamo eseguito con successo la prima implementazione della produzione della proteina ricombinante e la sua caratterizzazione mediante Dicroismo Circolare (CD), risonanza magnetica nucleare (NMR) e *Dynamic Light Scattering* (DLS). Abbiamo dimostrato che Pvfp-5β prodotta mediante tecniche ricombinanti si ripiega come la forma nativa e risulta ricca di elementi di struttura secondaria di tipo beta. Abbiamo inoltre analizzato in dettaglio le proprietà di aggregazione e adesione di Pvfp-5β come parte di un coinvolgimento a lungo termine finalizzato alla caratterizzazione di

un potenziale biomateriale basato su tale proteina. Nel complesso, i nostri risultati mostrano che il Pvfp-5β ha proprietà adesive intrinseche anche in assenza della modifica post-traduzionale DOPA. Queste proprietà rendono la proteina un eccellente ed efficiente materiale che potrebbe essere utilizzato in diverse applicazioni biomediche inclusa la rigenerazione di tessuti danneggiati.



## OBIETTIVI PER IL 2019

Gli studi futuri prevedono un confronto dettagliato tra le proprietà delle proteine da *Perna viridis* native e quelle acquisite in seguito la modifica post-traduzionale DOPA. Essere riusciti quest'anno a mettere a punto lo schema per la produzione della Pvfp-5β ricombinante, ci dà la possibilità di ottimizzare rapidamente le condizioni di espressione e purificazione anche per gli altri due membri della famiglia: Pvfp-3a e Pvfp-6. Questo ci permetterà in futuro di produrre quantità adeguate delle tre proteine superando la necessità di doverli purificare direttamente dalla cozza. La produzione di ricombinanti fornisce anche maggiore flessibilità per ottenere la proteina con e senza modifiche post-traduzionali, permettendoci la caratterizzazione biofisica e la determinazione della struttura tridimensionale delle tre proteine ricombinanti da *Perna viridis* con e senza modifica DOPA.



## CONFERENZE

UK-Israel Synergy Symposium - Protein misfolding in ageing and neurodegeneration: from basic biology to drug development, Marzo, 2018, Londra (Regno Unito)



## PUBBLICAZIONI

Martínez-Lumbreras S, Alfano C, Evans NJ, Collins KM, Flanagan KA, Atkinson RA, Krysztowska EM, Vydyanath A, Jackter J, Fixon-Owoo S, Camp AH, Isaacson RL. (2018) Structural and Functional Insights into Bacillus subtilis Sigma Factor Inhibitor, CsfB. *Structure*, 26(4):640-648. doi: 10.1016/j.str.2018.02.007

Pecci A, Ragab I, Bozzi V, De Rocco D, Barozzi S, Giangregorio T, Ali H, Melazzini F, Sallam M, Alfano C, Pastore A, Balduini CL, Savoia A. (2018) Thrombopoietin mutation in congenital amegakaryocytic thrombocytopenia treatable with romiplostim. *EMBO Mol Med*. 10(1):63-75. doi: 10.15252/emmm.201708168



Modello della struttura di Pvfp-5β basato sull'omologia di sequenza con la proteina Notch ligand delta-like 1 (PDB ID: 4xbm).



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

# 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 risposta ideale alle 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 migliorare 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, 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 2018**

La ricerca svolta in precedenza ha condotto all'ottimizzazione del disegno e della metodologia costruttiva di un nuovo dispositivo TAVI. Nell'ultimo anno, si è studiata la possibilità realizzare i lembi protesici e la cuffia di tenuta con un polimero alternativo, già validato in termini di biocompatibilità e biostabilità. La caratterizzazione meccanica di questo polimero ne ha confermato l'idoneità all'applicazione. Il processo di produzione dei lembi e della cuffia di tenuta è stato sostanzialmente modificato ed ottimizzato ed una serie di prototipi di valvole di dimensioni medie (dimensione nominale 26 mm) è stata costruita con successo. Test *in vitro* hanno confermato che le prestazioni idrodinamiche dei dispositivi soddisfano i requisiti richiesti dallo standard internazionale ISO 5840-3:2013. Test *in vitro* di durata hanno dimostrato che la tecnologia proposta garantisce i requisiti di durata richiesti per le valvole protesiche a lembi flessibili (200 milioni di cicli). Finanziamenti per avviare la valutazione cronica su animale sono stati ottenuti con successo.

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

**OBIETTIVI PER IL 2019**

Saranno realizzati una serie di prototipi di valvole e cateteri di impianto, basati sulla tecnologia sviluppata. La validazione idrodinamica verrà eseguita in un simulatore cardiaco idromeccanico, così da garantire che i prototipi delle valvole soddisfino i requisiti stabiliti nella normativa ISO 5840-3:2015. Infine, la valutazione preclinica verrà svolta mediante impianti in animale in modelli ovini (50-70 kg). La valutazione *in vivo* 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.

**CONFERENZE**  
Ri.MED Research Retreat, Ottobre 2018, Palermo (Italia).

**PROPRIETÀ INTELLETTUALE**  
Burriesci, G., Bozkurt, S., Rahmani, B., Mullen, M.J. (2018) Prosthesis heart valve. Patent EP3310301 (A1)

Burriesci, G., Bozkurt, S., Rahmani, B., Mullen, M.J. (2018) Prosthesis heart valve. Patent EP3310301 (A1)



Immagine del dispositivo transcateretere



Sequenza di impianto del dispositivo



# 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 bioprotesiche normalmente 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 biomedica 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, finora i trattamenti anti-calcificanti sviluppati non si sono dimostrati efficaci nei giovani adulti. I nostri collaboratori 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 con una sostanza, chiamata Gal, non prodotta nell'uomo, ma sviluppata nei

## 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. Queste ultime utilizzano lembi biologici normalmente estratti dalle valvole cardiaca umane o suine, o realizzate utilizzando pericardio animale. Le valvole cardiache biologiche sono preferibili nei pazienti più anziani (> 60 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, nel 100% 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, migliorandone 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 2018

Tutte le gravidanze programmate per generare suini transgenici (con inibizione dell' $\alpha$ 1,3-galattosiltransferasi) sono state ottenute con successo dal partner team del Prof. McGregor. Sono stati realizzati alcuni set di valvole utilizzando pericardio standard e pericardio transgenico, mediante un approccio di fabbricazione sviluppato dal nostro gruppo. I prototipi sono stati testati *in vitro* per verificarne le prestazioni idrodinamiche, selezionando poi tre campioni per ciascun gruppo in maniera arbitraria per effettuarvi test di vita accelerata. Tutte le valvole testate hanno soddisfatto i requisiti idrodinamici della normativa internazionale ISO5840 e garantiscono durate superiori ai 30 milioni di cicli, superando gli obiettivi pianificati nell'attuale progetto.



## OBIETTIVI PER IL 2019

Le valvole precedentemente sviluppate saranno utilizzate in impianti di sostituzione della valvola mitrale su pecora, e lasciate per 90 giorni. Lo studio sarà mirato a rilevare la presenza di rischi imprevisti associati alle valvole transgeniche, confrontando le loro prestazioni con quelle delle valvole equivalenti realizzate in pericardio di animali standard, dopo 90 giorni di funzionamento nel modello ovino. Lo studio confronterà la mortalità, la funzione emodinamica della valvola (*effective orifice area*, movimento dei lembi, rigurgito e caduta di pressione transvalvolare) misurata mediante ecocardiografia, la deposizione di trombi cardiaci, la formazione di *pannus*, ed i livelli di infiammazione, calcificazione e deterioramento strutturale della valvola (determinata mediante analisi istologica).



## CONFERENZE

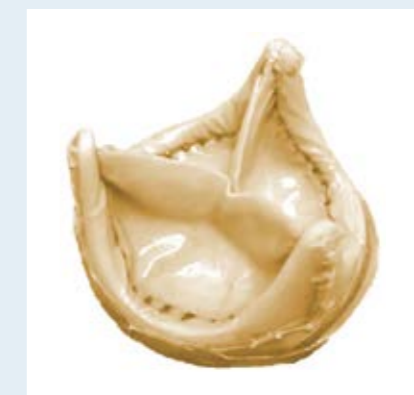
Rahmani, B., Salmonsmith, J., McGregor, C.G.A., Byrne, G.W., Burriesci, G. (2018) In Pursuit of a Durable Porcine Pericardial Bioprosthesis: A Proof of Concept Study. 8th Biennial Heart Valve Biology & Tissue Engineering Meeting, Londra, Regno Unito

McGregor, C.G.A., Rahmani, B., Byrne, G.W., Burriesci, G. (2018) Physical and Hydrodynamic Equivalency of Wild Type and alpha-Gal Free GTKO Porcine Pericardium; A New Source Material For Bioprosthetic Heart Valves. Annual Scientific Meeting of the Heart Valve Society, New York, Stati Uniti d'America.



## PROPRIETÀ INTELLETTUALE

Burriesci, G., Rahmani, B., Byrne, G., Mc Gregor, C. (2018) Bioprosthetic heart valve. Patent n. WO2018011592 A1.



Prototipo della valvola

# 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

## IMPATTO

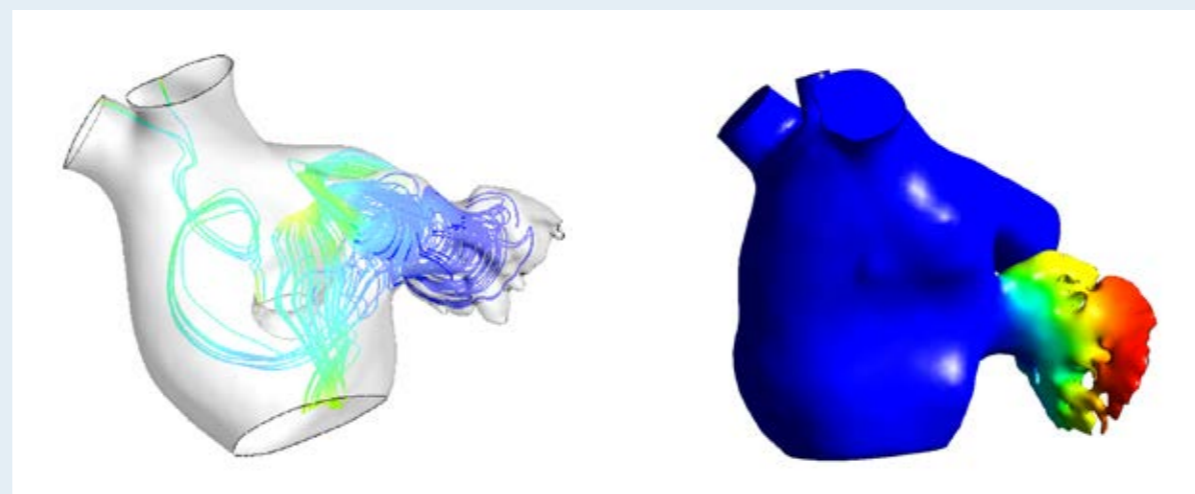
Lo studio mira ad identificare le caratteristiche morfologiche dell'appendice atriale sinistra che favoriscono l'insorgere della patologia, al fine di individuare i pazienti più a rischio. L'approccio proposto si presta ad offrire uno strumento avanzato per l'analisi quantitativa di parametri non facilmente misurabili clinicamente, e per lo studio dei fattori geometrici che più influenzano la formazione dei trombi, contribuendo agli eventi ischemici. Infine, la metodologia proposta, supportando la stratificazione clinica dei soggetti ad alto rischio di formazione di trombi, potrebbe indirizzare la selezione di terapie individualizzate che migliorino la sicurezza e lo standard di cura del paziente.

## PIPELINE



## BREVE DESCRIZIONE

Gli eventi tromboembolici, principalmente causati dalla fibrillazione atriale, affliggono l'1-2% della popolazione. Più del 90% dei trombi atriali sinistri che ne sono responsabili hanno origine nell'appendice atriale sinistra, una proiezione simile a un dito trabecolato, di lunghezza normalmente variabile dai due ai quattro centimetri, che si diparte dalla camera principale dell'atrio sinistro. I trattamenti attualmente adottati per prevenire eventi tromboembolici consistono nell'anticoagulazione orale, nell'esclusione chirurgica dell'appendice o nella sua occlusione percutanea. Tuttavia, il ruolo svolto dalla morfologia dell'appendice nel meccanismo di coagulazione è ancora poco compreso.



Mappa del rischio di trombosi stimato nei vari distretti di un'appendice atriale



## RISULTATI RAGGIUNTI NEL 2018

In collaborazione con il Great Ormond Street Hospital di Londra, Regno Unito, sono state ricostruite le anatomie dell'atrio sinistro e dell'appendice atriale su oltre cinquanta casi paziente-specifici. Queste sono state utilizzate per avviare uno studio di analisi statistica delle forme dell'appendice, con l'obiettivo di identificare parametri oggettivi di caratterizzazione e classificazione delle morfologie.

Alcune anatomie rappresentative sono state utilizzate per realizzare modelli fisici ottenuti mediante prototipazione rapida (stampa 3D). Questi sono integrabili nei setup disponibili per la simulazione dell'emodinamica cardiaca e, essendo realizzati in materiali otticamente trasparenti, si prestano all'utilizzo di comuni tecniche di fluidodinamica sperimentale.



## OBIETTIVI PER IL 2019

Verrà proseguito lo studio di analisi statistica delle morfologie dell'appendice atriale sinistra, con l'obiettivo di ottenere approcci utilizzabili a livello clinico per determinare una classificazione oggettiva delle diverse anatomie.

In parallelo, i modelli fisici precedentemente realizzati saranno utilizzati per effettuare una validazione della piattaforma computazionale già implementata nel gruppo di ricerca. Quest'ultima verrà poi impiegata per impostare simulazioni numeriche mirate ad identificare i parametri morfologici dell'appendice che risultano più direttamente responsabili per l'insorgere di condizioni emodinamiche associate al rischio trombogenico in condizioni normali e di fibrillazione atriale.



## CONFERENZE

Bosi, G.M., Cook, A., Rai, R., Menezes, L., Schievano, S., Torii, R., Burriesci, G. (2018) Prediction of thrombosis risk by computational fluid dynamic simulations in the left atrial appendage. VPH-CaSE Young Researchers' Conference: Frontiers of Simulation and Experimentation for Personalised Cardiovascular Management and Treatment, Londra, Regno Unito

Bosi, G.M., Cook, A., Rai, R., Menezes, L., Torii, R., Burriesci, G. (2018) On the relation between different Left Atrial Appendage morphologies and thrombosis risk: a Computational Fluid Dynamic analysis. 8th World Congress of Biomechanics, Dublino, Irlanda (P2043)



## PUBBLICAZIONI

Bosi, G.M., Cook, A., Menezes, L., Schievano, S., Torii, R., Burriesci, G. (2018) Computational Fluid Dynamic Analysis of the Left Atrial Appendage to Predict Thrombosis Risk. Frontiers in Cardiovascular Medicine 5:34. doi: 10.3389/fcvm.2018.00034





# Predizione del potenziale di lesioni ischemiche a seguito di terapie cardio-valvolari

Gaetano Burriesci, PhD  
gburriesci@fondazionerimed.com



## COLLABORAZIONI

University College London (UCL), Londra, Regno Unito



## AREA TERAPEUTICA

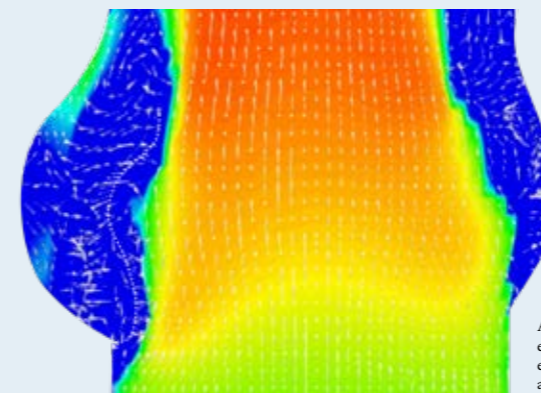
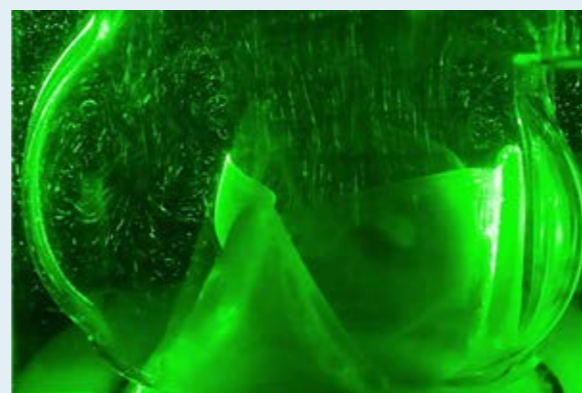
Insufficienze d'organo  
Patologie dell'invecchiamento

## 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 nuove soluzioni terapeutiche, come dispositivi cardiovascolari superiori 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.



Analisi sperimentale e numerica dei flussi ematici nella radice aortica

## IMPATTO

L'obiettivo principale dello studio è sviluppare una nuova piattaforma che integri approcci sperimentali e numerici, capace di approfondire le attuali conoscenze sulla fluidodinamica che si stabilisce nei distretti valvolari, in condizioni sane, patologiche e post-trattamento clinico. Questa piattaforma potrà essere un valido supporto nella valutazione delle prestazioni emodinamiche di diversi fenotipi anatomici, situazioni patologiche e dispositivi valvolari. Ciò è essenziale per poter migliorare la sicurezza e l'efficacia dei trattamenti valvolari e fornire informazioni a supporto della selezione della terapia più adatta ad uno specifico paziente. Inoltre, le tecnologie implementate possono risultare strumenti importanti per lo sviluppo di soluzioni cliniche e dispositivi medici di prossima generazione.



## RISULTATI RAGGIUNTI NEL 2018

È stato effettuato uno studio combinato sperimentale e numerico della fluidodinamica nel distretto della radice aortica. In particolare, lo studio sperimentale è stato condotto su una valvola cardiaca porcina, installata in un simulatore cardiaco ed analizzata mediante velocimetria PIV.

Il modello numerico è stato basato su un approccio di interazione fluido-strutturale (FSI), così da descrivere sia il comportamento meccanico dei tessuti, che la fluidodinamica ematica. Quest'ultimo è stato calibrato fino a replicare l'esperimento con livelli di accuratezza soddisfacenti, così ottenendone una validazione sistematica. Quindi, è stato modificato per superare i principali limiti del setup sperimentale e modellare la situazione fisiologica ottimale. Quest'approccio sinergico ha condotto ad una comprensione più completa dei meccanismi che determinano la funzione della valvola aortica in condizioni sane, individuando, per la prima volta, fenomeni critici precedentemente ignorati.



## OBIETTIVI PER IL 2019

Lo studio sinora condotto indica che il meccanismo operativo della valvola aortica sana sarebbe notevolmente diverso da quanto riportato ad oggi dalla letteratura specialistica, ed ampiamente più efficiente in termini di prestazioni idrodinamiche. Nella seguente fase del progetto sarà essenziale trovare ulteriori conferme di questo risultato, dal momento che le implicazioni in termini di approcci progettuali nel campo delle valvole artificiali biologiche potrebbero essere fondamentali. Inoltre, la piattaforma precedentemente sviluppata sarà completata includendo la presenza delle coronarie e studiando la loro interazione con il flusso principale. Il modello così implementato servirà come punto di riferimento per l'analisi dell'effetto clinico delle alterazioni del flusso indotte da patologie e interventi terapeutici, come l'impianto di valvole cardiache chirurgiche o transcateretere.



## CONFERENZE

Tango, A.M., Salmon, J.A., Ducci, A., Burriesci, G. (2018) Fluid-structure-interaction model of a Prosthetic Aortic Valve Implantation configuration: comparison with an in-vitro study. VPH-CaSE Young Researchers' Conference: Frontiers of Simulation and Experimentation for Personalised Cardiovascular Management and Treatment, Londra, Regno Unito

Salmon, J., Tango, A.M., Ducci, A., Burriesci, G. (2018) Validation of Fluid Structure Interaction Models of the Aortic Valve with In-Vitro Testing. 8th World Congress of Biomechanics, Dublino, Irlanda. (O1034)



## PUBBLICAZIONI

Tango, A.M., Salmonsmitth, J., Ducci, A., Burriesci, G. (2018) Validation and Extension of a Fluid-Structure Interaction Model of the Healthy Aortic Valve. Cardiovascular Engineering and Technology 9(4): 739-751.



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

# Simulazione in vitro di terapie della valvola mitrale

Gaetano Burriesci, PhD  
gburriesci@fondazionerimed.com



## COLLABORAZIONI

University College London (UCL), Londra, Regno Unito  
Great Ormond Street Hospital (GOSH), Londra, Regno Unito



## AREA TERAPEUTICA

Insufficienze d'organo  
Patologie dell'invecchiamento

## PIPELINE



## BREVE DESCRIZIONE

Il rigurgito mitralico, ovvero il reflusso del sangue attraverso la valvola mitrale, è l'affezione valvolare cardiaca più comune e, se non trattato, porta spesso a complicazioni potenzialmente letali. Clinicamente, sono disponibili vari tipi di trattamento per la riparazione della valvola nativa o la sua sostituzione, al fine di ripristinare la funzione valvolare. Tuttavia, a causa della grande eterogeneità anatomica che caratterizza le patologie mitrali, risulta spesso difficile valutare e confrontare i rischi e i risultati dei differenti approcci terapeutici. Pertanto, al fine di migliorare la sicurezza e l'efficacia dei trattamenti della valvola mitrale, è essenziale implementare nuovi modelli che meglio riproducano i meccanismi funzionali della valvola mitrale patologica sotto diverse condizioni operative, così consentendo di acquisire una migliore comprensione del contributo di ciascun elemento dell'apparato mitrale.



Campione di valvola mitrale suina utilizzata nel test



## IMPATTO

Questo progetto mira a realizzare il modello fisico di una valvola mitrale *ex-vivo* in un sistema circolatorio chiuso che riproduce la corretta funzione fisiologica. Il modello consentirà il controllo totale dei parametri anatomici che determinano il malfunzionamento della valvola mitrale (come la posizione dei muscoli papillari e la conformazione dell'*anulus*). Il sistema sperimentale così realizzato fornirebbe uno strumento essenziale per comprendere la funzione e l'eziologia della valvola mitrale e servirebbe da punto di riferimento per la predizione dell'efficacia dei trattamenti attualmente disponibili e lo sviluppo di nuove soluzioni terapeutiche. Inoltre, il modello fisico di una valvola mitrale disfunzionale fornirà informazioni essenziali per la validazione di modelli computazionali di tale organo.



## RISULTATI RAGGIUNTI NEL 2018

È stato sviluppato un nuovo banco di prova che consente la possibilità di fissare una valvola mitrale *ex-vivo* in un simulatore cardiaco idromeccanico. Il sistema permette la regolazione accurata dei principali parametri anatomici che controllano la funzione della valvola mitrale, quali la posizione dei muscoli papillari e la conformazione dell'*anulus*, e include una camera ventricolare sinistra contrattile in materiale sintetico. Il banco di prova è stato utilizzato con successo per riprodurre le prestazioni di una serie di valvole mitrali suine in varie condizioni operative, valutando l'effetto della posizione dei muscoli papillari sull'efficienza della valvola e sul rigurgito mitralico. I risultati si sono dimostrati coerenti con i dati riportati da analisi *in vivo* su modelli suini e forniscono la relazione tra i parametri geometrici della valvola mitrale e il rischio di rigurgito mitrale.



## OBIETTIVI PER IL 2019

Sulla base dell'esperienza acquisita sulle valvole mitrali *ex-vivo* con il sistema di test implementato, verrà proposta una classificazione standardizzata dei parametri geometrici clinici essenziali per definire la funzione della valvola mitrale. Il sistema verrà inoltre utilizzato a supporto dello sviluppo, validazione e revisione progettuale di nuovi trattamenti per la patologia mitralica, tra cui varie di soluzioni percutanee per la riparazione e la sostituzione della valvola mitrale. Inoltre, sarà studiato l'impatto del modello di valvola mitrale utilizzato sulla valutazione delle prestazioni emodinamiche e dell'efficienza della valvola aortica, al fine di identificare i potenziali limiti degli attuali requisiti normativi e, ove necessario, suggerirne rettifiche.



## CONFERENZE

Zhou, W., Bozkurt, S., Cheang, M.H., Schievano, S., Burriesci, G. (2018) In-Vitro Modeling of Mitral Valve Therapies. BioMedEng18 Conference, Londra, Regno Unito (ISBN 978-1-9996465-0-9)

Zhou, W., Bozkurt, S., Cheang, M.H., Schievano, S., Burriesci, G. (2018) An in-vitro model for the assessment of mitral valve therapies. Cardiovascular Innovations 2018, Denver, Stati Uniti d'America.



Simulazione *in vitro* della funzione della valvola mitrale in condizioni sane e disfunzionali

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

Antonio D'Amore, PhD  
adamore@fondazionerimed.com

**COLLABORAZIONI**  
Politecnico di Milano, Italia  
University of Pittsburgh, U.S.A.  
Universidad de Zaragoza, Spagna

**AREA TERAPEUTICA**  
Insufficienze d'organo  
Patologie dell'invecchiamento

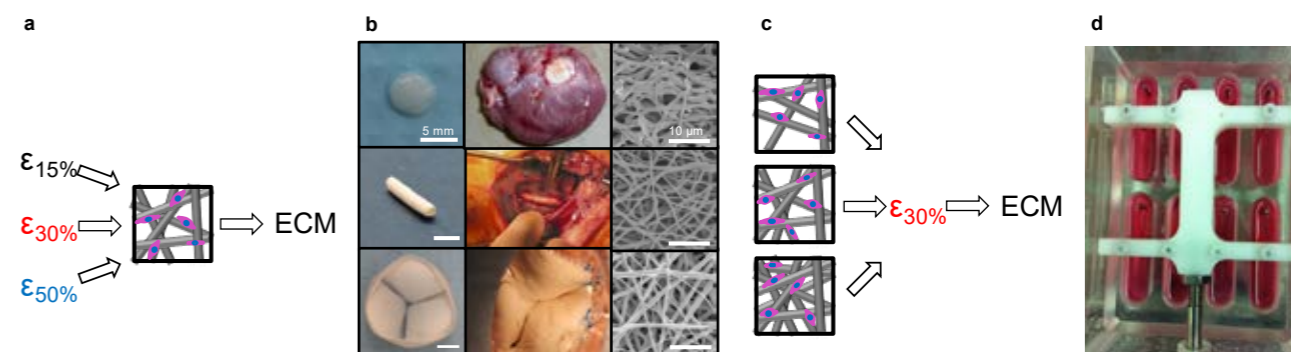
## PIPELINE



## BREVE DESCRIZIONE

Modelli elastomerici *in vitro* per lo studio della meccano-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 della sua 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 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 tissutale e degradazione di materiale.

BE-ECM. Meso scale topological cues affect extracellular matrix production in an elastomeric scaffold model for cardiac tissue engineering applications. A) Previous hypothesis: different strain magnitudes induce different levels of ECM elaboration on vascular smooth muscle cell (VSMC) seeded polyurethane, electrospun scaffold model, mechanical load acting on the scaffold is imposed by the bioreactor. B) Examples of cardiac tissue engineering applications: pre-implants (left), in situ (center) and fiber based micro-structure (right) of polyurethane cardiac patch, vascular graft and heart valve processed by electrospinning, mechanical load acting in these setting are imposed by the physiology. C) Hypothesis for this study: given a specific mechanical load acting on a cell seeded polyurethane scaffold, different levels of ECM elaboration can be achieved by altering material topology at the meso scale. D) Custom made stretch bioreactor utilized in the study, top view shows the eight well plate chamber, the actuator arm connected with steel rod to the linear motor and the vertical pins holding the ring shape samples



## 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 l'impatto di segnali topologici e meccanici sull'elaborazione di ECM. Tale potenziale modellistico consente in sintesi di ampliare la conoscenza della meccano-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 tissutale, modulazione dei profili di degradazione, orientamento della differenziazione cellulare.

## RISULTATI RAGGIUNTI NEL 2018

La piattaforma *in silico* sviluppata a partire dal 2009 prevede l'impiego di scaffold polimerici di natura fibrosa in grado di sostenere larghe deformazioni combinate 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 è 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 permesso 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 l'apparato di condizionamento meccanico di corde tendinee; implementare l'apparato per indurre degradazione accelerata di valvole cardiache polimeriche.

**Attività di docenza**  
(2017-2018) Mentor for BIOENG 1095 - Special projects. Individual research project under the guidance of a faculty member. Department of bioengineering, Univ. of Pittsburgh. Trainees: David Jacob Li-Ming, Armaan A. Fazal.

**Attività di tutoraggio**  
A. Adamo, 2018-2020, University of Palermo Italy, engineered chordae development;  
H. Dagan 2017-2018, ORT Braude College Israel, engineered chordae mechanical conditioning;  
D. Jacob Li-Ming, 2016-present, Univ. of Pittsburgh USA, quantitative methods for ECM mass detection.

**Lezioni su invito**  
(09/2018 - in corso) Chair del seminario "wound healing and repair", University of Pittsburgh, Pittsburgh, USA

## OBIETTIVI PER IL 2019

Perfezionare e promuovere la piattaforma sperimentale BE-ECM, in particolare:  
- Sottomettere un articolo come primo autore su tema effetti della degradazione sulla meccanica e struttura di valvole cardiache polimeriche;  
- Individuare il 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.

**PUBBLICAZIONI**  
[J. A. I] A. D'Amore, G. Nasello, S. Luketich, D. Denisenko, D. Jacob-Li Ming, R. Hoff, G. Gibson, A. Bruno, M. T. Raimondi, and W. R. Wagner. Meso-scale topological cues influence extracellular matrix production in an elastomeric scaffold model. *In press* on Soft Matter, IF 3.89



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

Antonio D'Amore, PhD  
adamore@fondazionerimed.com



## COLLABORAZIONI

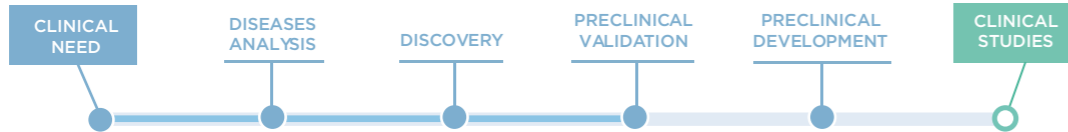
University of Pittsburgh Medical Center, U.S.A.  
Politecnico di Milano, Italia



## AREA TERAPEUTICA

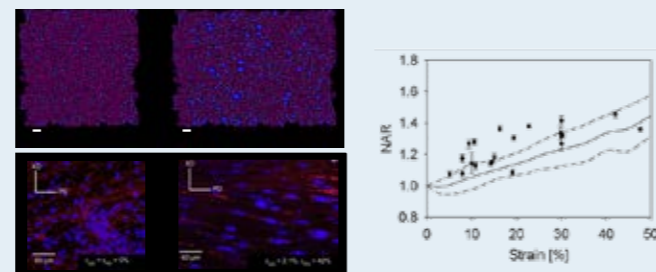
Insufficienze d'organo  
Cancro  
Patologie dell'invecchiamento

## PIPELINE



## BREVE DESCRIZIONE

Sviluppo di modelli numerici strutturali deterministici per predizione della meccanica, crescita di tessuto endogeno 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 a questi tre differenti fronti introducendo e perfezionando modelli strutturali deterministici di tessuti ingegnerizzati e nativi.



NET-MTG: Meso scale level validation and prediction. Model prediction for NAR vs. strain are provided in (a-c), and compared quantitatively (c) and qualitatively (a-b) with the experimental data [inter fibers voids are represented in dark purple at ePD=eXD= 0% (starting configuration g-h left) and ePD=40%, eXD=0% (final stretched configuration g-h right) whereas the fibers are represented in magenta.

## IMPATTO

Questa ricerca ha potenzialmente impatto su diversi temi di biomeccanica computazionale e la progettazione di biomateriali quali:

- 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 e 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 2018

- 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*.
- Capacità 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). Attività a supporto del NIH-R01 attualmente in corso in collaborazione con Dr F. Ambrosio.
- Capacità di riprodurre topologia di materiali a natura fibrosa.

## Fondi di ricerca ottenuti e/o gestiti

(2016-2021) NIH R01, 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 (8% efforts), W. Wagner, D. Stolz, University of Pittsburgh.

## Premi conseguiti

(06/2018) Aging Cell Best Paper Prize 2017' for: " K. Stearns-Reider, A. D'Amore, K. Beezhold, B. Rothrauff, L. Cavalli, W. Wagner, D. Vorp, A. Tsamis, Changqing Zhang, A. Barchowsky, T. A. Rando, R. Tuan, F. Ambrosio. Aging of the skeletal muscle extracellular matrix drives a stem cell fibrogenic conversion', Aging Cell 2017 16 (3),518-528". La Anatomical Society

l'ha premiato come miglior articolo dell'anno.

## Attività di docenza

(11/2015-11/2018) *Guest lecturer* per il programma di PhD di Ingegneria Biomedicale, MSCMP 3735, presso il Dipartimento di Bioingegneria dell'Università di Pittsburgh. Titolo: "Cardiac ECM: structure - function, damage mechanism, and tissue engineering approaches to facilitate constructive remodeling".

## Attività di tutoraggio

C. T. Rhoades "FEM of the chordal apparatus" (2018 - in corso), School of Medicine, Università di Pittsburgh USA.

## Lezioni su invito

(09/2018 - in corso ) Chair del seminario " wound healing and repair", Università di Pittsburgh, USA.



## OBIETTIVI PER IL 2019

Gli obiettivi per i 2019-2021 sono in linea con il ruolo ancillare che questa linea di ricerca svolge nell'ambito del programma di ingegneria di tessuto cardiovascolare della Fondazione RiMED 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. Badylak, 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. Badylak, B. A. Freeman, W.R. Wagner. Nitro-oleic acid (NO<sub>2</sub>-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.



## PUBBLICAZIONI

[J. A. 1] A. D'Amore, G. Nasello, S. Luketich, D. Denisenko, D. Jacob-Li Ming, R. Hoff, G. Gibson, A. Bruno, M. T. Raimondi, and W. R. Wagner. Meso-scale topological cues influence extracellular matrix production in an elastomeric scaffold model. *In press*, *Soft Matter*, IF 3.89



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, U.S.A.  
PECA Lab (Carnegie Mellon University Spin-off), Pittsburgh, U.S.A.  
Università degli Studi di Palermo, Italia  
University of Nagoya, Giappone

## AREA TERAPEUTICA

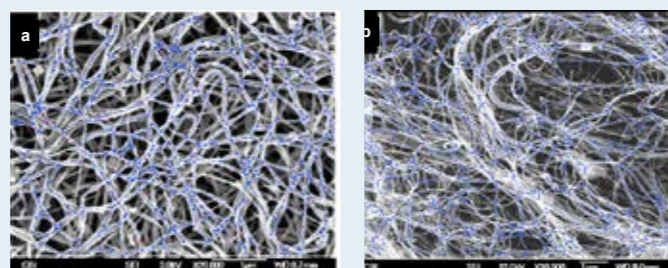
Insufficienze d'organo  
Patologie dell'invecchiamento  
Cancro

## PIPELINE



## BREVE DESCRIZIONE

Tema: NET-IBA, sviluppo di algoritmi e metodi automatici per l'analisi strutturale e morfologica di tessuti nativi e scaffold. 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.



NET-IBA:  
A) Rabbit MSC seeded collagen gel analysis, detected fiber network and fiber diameters.  
B) Decellularized rat carotid arteries analysis, detected fiber network and fiber diameters.

## IMPATTO

Il software sviluppato in questa linea di ricerca ha un 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 2018

- 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 Takana-ri, 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 i Dr. Bruno, Ardizzone e Pirrone dell'Università di Palermo.

## Fondi di ricerca ottenuti e/o gestiti

(2016-2021) NIH R01, Dysfunctional muscle remodeling and regeneration in environmental disease, \$ 2.6 milioni. PIs: F. Ambrosio, A. Barchowski, University of Pittsburgh. Co-Investigators: A. D'Amore (8% efforts), W. Wagner, D. Stolz, University of Pittsburgh;

## Premi conseguiti

(06/2018) Aging Cell Best Paper Prize 2017' for: " K. Stearns-Reider, A. D'Amore, K. Beezhold, B. Rothrauff, L. Cavalli, W. Wagner, D. Vorp, A. Tsamis, Changqing Zhang, A. Barchowski, T. A. Rando, R. Tuan, F. Ambrosio. Aging of the skeletal muscle extracellular matrix drives a stem cell fibrogenic conversion", Aging Cell 2017 16 (3),518-528". La *Anatomical Society* l'ha premiato come miglior articolo dell'anno.

## Attività di tutoraggio

A. Adamo, 2018-2020, Università di Palermo, "Cardiac patch development";  
H. Dagan 2017-2018, ORT Braude College Israel, "Engineered chordae tendineae mechanical conditioning";  
D. Jacob Li-Ming, 2016-present, University of Pittsburgh USA, "Quantitative methods for ECM mass detection";  
D. Pedersen, 2015-present, University of Pittsburgh USA, Whi-

taker scholar, PIV study of electrospun tri-leaflets valves;  
S. Luketich, 2013-present, University of Pittsburgh USA, biaxial testing of cardiac and abdominal wall explants

## Lezioni su invito

(09/2018 - in corso) Chair del seminario "Wound healing and repair", Università di Pittsburgh, USA.

## OBIETTIVI PER IL 2019

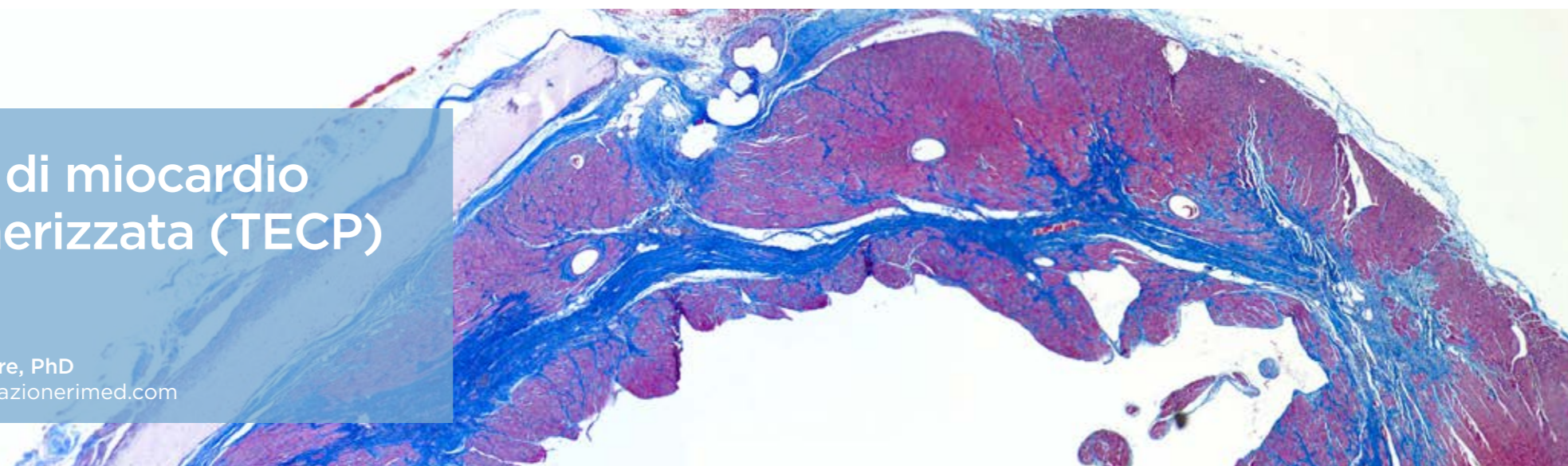
- Estendere al 3D i metodi di analisi 2D sviluppati per materiali micro e nano strutturati. La corrente versione del software di analisi sviluppato "Gordium" prevede l'impiego di dati 2D da microscopia elettronica, la ricerca pianificata per il 2018-2021 prevede l'estensione di questo metodo su 3D e sulla base di dati da microscopia confocale;
- Completare la validazione delle 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 (NO<sub>2</sub>-OA) release enhances regional angiogenesis in a rat abdominal wall defect model. Published on *Tissue Engineering Part A*."

## PUBBLICAZIONI

- [J. A. 4] T. K. Valencia-Rivero, J. C. Cruz, J. C. Briceño, A. D'Amore, S-H Ye, J. Vande Geest, W. R Wagner. Decreased platelet deposition in SIS-based vascular grafts via covalent conjugation of RAFT polymers. 2018 IX International Seminar of Biomedical Engineering (SIB), 1-6, IF NA.
- [J. A. 3] A. D'Amore, G. Nasello, S. Luketich, D. Denisenko, D. Jacob-Li Ming, R. Hoff, G. Gibson, A. Bruno, M. T. Raimondi, and W. R. Wagner. Meso-scale topological cues influence extracellular matrix production in an elastomeric scaffold model. In press on Soft Matter, IF 3.89
- [J. A. 2] 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 (NO<sub>2</sub>-OA) release enhances regional angiogenesis in a rat abdominal wall defect model. *Tissue Engineering Part A*, 2018 Jun;24(11-12):889-904, IF 3.58. McGowan Institute for Regenerative Medicine' paper and picture of the month (12-2017).
- [J. A. 1] A. D'Amore, S. K. Luketich, G.M. Raffa, S. Olia, G. Menallo, A. Mazzola, F. D'Accardi, T.Grunberg, X. Gu, M. Pilato, M. V. Kameneva, V. Badhwar, W.R. Wagner. Heart valve scaffold fabrication: bioinspired control of macro-scale morphology, mechanics and micro-structure. *Biomaterials* 2018, 150, 25-37, 5Y-IF 8.97.

# Parete di miocardio ingegnerizzata (TECP)

Antonio D'Amore, PhD  
adamore@fondazionerimed.com



## COLLABORAZIONI

University of Pittsburgh, Pittsburgh, U.S.A.  
University of Pittsburgh Medical Center, Pittsburgh, U.S.A.  
University of Cincinnati, Cincinnati, U.S.A.  
IRCCS ISMETT, Palermo, Italia  
Mario Negri, Milano, Italia  
Universidade Estadual de Campinas, Campinas, Brasil  
University of Texas, Austin, U.S.A.  
Virginia Commonwealth University, Richmond, U.S.A.  
ATeN Center, Università di Palermo, Italia

## AREA TERAPEUTICA

Insufficienze d'organo

## IMPATTO

L'obiettivo di questa linea di ricerca è 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 2018

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. Completato 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

(2018-2020) 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;  
(2014-2018) Armed Forces Institute of Regenerative Medicine, AFIRMII, W81-XWH-13-2-XXXX, \$900,000. Creating innervated vascularized muscle flaps from elastic, cellularized biocomposites developed *in situ* for facial muscle reconstruction. PI: W. Wagner, Project leader: A. D'Amore, University of Pittsburgh.

### Premi conseguiti

(9/2018) Vincitore a *ISSNAF Awards*, cerimonia che premia i migliori ricercatori italiani under 40 in USA e Canada; primo premio nella categoria "Franco Strazzabosco Award" per l'ingegneria.  
(05/2018) *Honorable mention* nella categoria "Advanced manufacturing and materials" ai Carnegie Science Awards 2018.

### Attività di docenza

(2017-2018) Mentor for BIOENG 1095 - Special projects. Individual research project under the guidance of a faculty member. Department of bioengineering, Univ. of Pittsburgh.  
(11/2015-11/2018) Guest lecturer for the biomedical engineering PhD program, MSCMP 3735. Department of bioengineering, University of Pittsburgh. Title: "Cardiac ECM: structure - function, damage mechanism, and tissue engineering approaches to facilitate constructive remodeling";

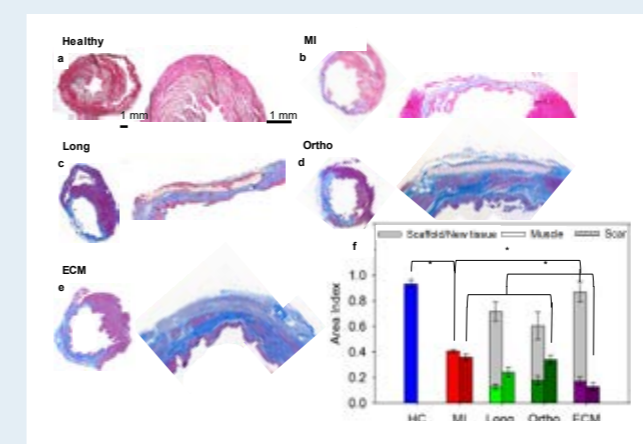
## PIPELINE



## 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 è 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 è 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* composti multi-strato dove lo strato dello *scaffold* a contatto con l'epicardio è costituito da matrice extracellulare bioattiva.



TECP: MT staining, muscle and scar area index. (A-E) Typical MT stained whole heart sections and infarct/patch regions at the 8 wk time point. The ECM scaffold explants showed higher host cell infiltration than either of the oriented PECUU patches. (F) Quantitative comparison of muscle, scaffold/newly formed tissue and scar areas in histological sections between patch types. n=6, mean ± sem, \*p<0.05.

(02/2016-02/2018) Guest lecturer for the biomedical engineering master of science program, BIOENG 2810. Department of bioengineering, University of Pittsburgh. Title: "A brief overview on polymers processing methods for soft tissue engineering".

#### Attività di tutoraggio

A. Adamo, 2018-2020, University of Palermo, Italy; Cardiac patch development;

D. Jacob Li-Ming, 2016-present, Univ. of Pittsburgh, USA, Quantitative methods for ECM mass detection;

S. Luketich, 2013-present, Univ. of Pittsburgh USA; Biaxial testing of cardiac and abdominal wall explants.

#### Lezioni su invito

(09/2018 - in corso ) Chair del seminario " wound healing and repair", Università di Pittsburgh, USA.



#### OBIETTIVI PER IL 2019

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 2019 sono:

- Valutazione di *scaffold* per *patch* cardiaco su modello animale di larga taglia, obiettivi primari: (I) mantenimento delle funzioni ventricolari; (II) crescita tissutale 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.
- Studio numerico dell'impatto dello spessore e modulo di elasticità degli *scaffold* utilizzati per il *patching* del miocardio, progetto in collaborazione con il Dr Soares e il Dr Sacks.



#### CONFERENZE

[C. P. 1] 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. L. M. Silveira-Filho, G. Coyan, A. D'Amore, S. K. Luketich, G. Menallo, A. Adamo, Y. Matsumura, N. Kashiya, W. R. Wagner. Proceedings of the Society for Biomaterials Annual Meeting (SfB 2019), 3rd -6h Aprile 2019 Seattle, Washington.



#### PUBBLICAZIONI

[J. A. 4] N. Kashiya, R. L. Kormos, Y. Matsumura, S. Higuchi, L. M. Silveira-Filho, G. Coyan, J. Hong Bin, A. D'Amore, W. R. Wagner. Adipose derived stem cells enhance cardiac function preservation of a biodegradable cardiac patch and increase vascularization in rats with subacute myocardial infarction. *Circulation*. 2018;138:A12295, IF 19.3.

[J.A. 3] 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*, 2018, S0022-5223(18)32289-X. IF 4.46.

[J. A. 2] Chen, S. Ye, Y. Zhu, S. Vesselin, T. Tarannum, A. D'Amore, S. K. Luketich, W. Gojiang, W. Wagner. Hybrid scaffolds of Mg alloy mesh reinforced polymer/extracellular matrix composite for critical-sized calvarial defect reconstruction. *Journal of Tissue Engineering and Regenerative Medicine*, 2018, 12(6):1374-1388, IF 4.71.



#### PROPRIETÀ INTELLETTUALE

[I. D. 1] US patent application PCT/US2018/061862, filed on 11/2018, topic: controlled release system/drug for angiogenesis, title: "Nitro-oleic acid (NO<sub>2</sub>-OA) controlled release platform to induce regional angiogenesis in abdominal wall repair". Lead innovator/developer: A. D'Amore.

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

# Valvole cardiache ingegnerizzate (TEHV)

Antonio D'Amore, PhD  
adamore@fondazionerimed.com



#### COLLABORAZIONI

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



#### AREA TERAPEUTICA

Insufficienze d'organo

#### PIPELINE



#### BREVE DESCRIZIONE

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

- caratterizzazione e riproduzione della struttura e meccanica delle valvole cardiache umane;
- progettazione, prototipazione e validazione di protesi valvolari innovative in grado di:
  - indurre crescita tissutale endogena;
  - incrementare la resistenza alla calcificazione;
  - ridurre la trombogenicità.
- sviluppo di tecnologie e strategie di intervento percutaneo transcateretere.

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 tissutale *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 USA. 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 è associata con diversi fattori di rischio in aggiunta ad una riduzione della qualità della vita del paziente.

La seconda categoria non richiede terapia anticoagulante cronica ma è 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 è 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 2018

Completata valutazione acuta su cavia di larga taglia per valvole polmonari e tricuspide, iniziato valutazione del prototipo di valvola mitrale su medesimo modello. Consolidata ed estesa proprietà intellettuale per la biofabbricazione di corde tendinee. Esteso il piano di caratterizzazione di tessuti cardiaci nativi includendo: valvole cardiache, miocardio, coronarie, corde tendinee. Iniziata caratterizzazione di campioni umani da donatore mediante collaborazione con Fondazione Core, USA. Consolidato OneValve IP portfolio.

### Fondi di ricerca ottenuti e/o gestiti

(2016-2018) Coulter foundation 2016 \$100,000. Co-PI: V. Badhwar, Co-PI: A. D'Amore, Co-PI: W. Wagner, University of Pittsburgh; (2016-2018) Clinical & Translational Science Institute (CTSI), University of Pittsburgh; \$50,000. Co-PI: A. D'Amore, Co-PI: W. Wagner, University of Pittsburgh; (2018) Dean's summer research program (DSRP) Pitt, \$3,000, student: C. T. Rhoades. Mentors: S. Pasta (RiMED-Palermo), A. D'Amore (Pitt-Pittsburgh).

(2017-2018) Industrial collaboration with Peca lab, start-up company created by Carnegie Mellon University, \$5,000 renewable consultancy service. PI: A. D'Amore.

### Premi conseguiti

(9/2018) Vincitore a *ISSNAF Awards*, cerimonia che premia i migliori ricercatori italiani under 40 in USA e Canada; primo premio nella categoria "Franco Strazzabosco Award" per l'ingegneria.

(05/2018) *Honorable mention* nella categoria "Advanced manufacturing and materials" ai Carnegie Science Awards 2018.

### Attività di docenza

(06/2018) Guest lecturer, lecture on "Heart valve diseases and tissue engineering approach to valve replacement", regenerative medicine summer school, endorsed by TERMIS and Society for Biomaterials, University of Pittsburgh, ~20 students;

### Attività di tutoraggio

A. Adamo, 2018-2020, University of Palermo Italy, engineered chordae development;

C. T. Rhoades 2018 - present, School of Medicine, University of Pittsburgh USA, engineered chordae FEM;

H. Dagan 2017-2018, ORT Braude College Israel, engineered chordae mechanical conditioning;

M. Luketich, 2016-2018, University of Pittsburgh USA, electro-spun aortic valve fabrication optimization;

### Lezioni su invito

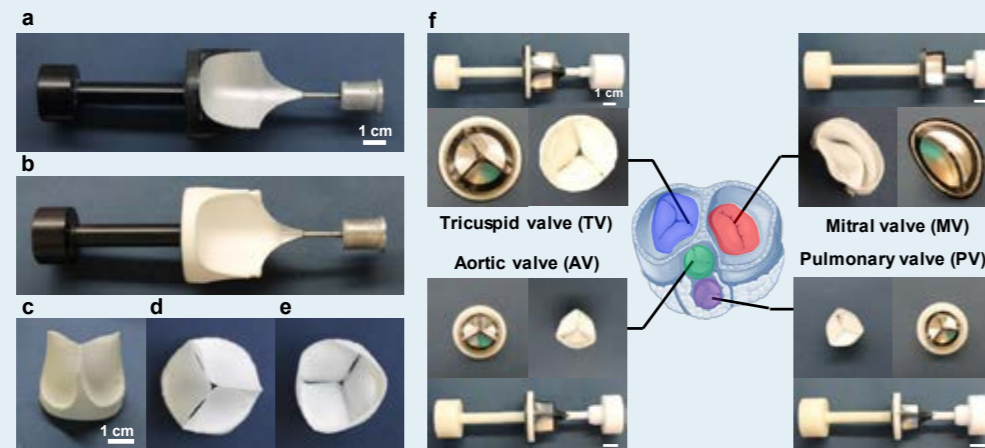
(03/2018) "Heart valve structure, functional heterogeneity and mechanics". McGowan Institute for Regenerative Medicine scientific retreat. Cardiovascular session, Pittsburgh, PA;

Vascularized muscle flaps from elastic, cellularized biocomposites developed *in situ* for facial muscle reconstruction. PI: W. Wagner, Project leader: A. D'Amore, University of Pittsburgh;

## OBIETTIVI PER IL 2019

L'obiettivo di lungo termine è la traslazione della tecnologia (class III FDA), obiettivi specifici per il 2019 sono definiti come segue:

- Completamento studio acuto su protesi mitrale DCD;
- Pubblicare risultati sullo studio completato riguardante la protesi tricuspide DCD;
- Stesura proposte progettuali per finanziare studio cronico per valvole atrio-ventricolari;
- Completamento studio in-vitro riguardante la mecano-biologia delle corde tendinee ingegnerizzate;
- 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 One-Valve;
- Promozione della tecnologia presso VC;
- Formazione personale: sette studenti di laurea master, due dottoranti;
- Consolidamento programma di internship McGowan Institute-UNIPA.



TEHV: Double component fiber deposition (DCD) process control of engineered heart valve morphology. a) Double component mandrel full assembly before fiber deposition. Mandrel component 1: non-conductive shield of acrylonitrile butadiene styrene (in black). Component 2: main collecting target of aluminum alloy. b) Double component mandrel after polymer fiber deposition. c) Tri-leaflet valve removed from the mandrel and trimmed, showing leaflet coaptation at rest. d) View from the ventricular side and e) view from the atrial side of the tri-leaflet valve. f) DCD processing method applied to the four valve types, prototypes shown in the picture demonstrate the capacity of DCD to generate valves with variable macro-scale morphology and size.

## CONFERENZE

- [C. P. 2] Acute *In Vivo* Functional Assessment of a Biodegradable Stentless Elastomeric Tricuspid Valve. G. Coyan, L. Silveira Filho, Y. Matsumura, S. Luketich, W. Katz, V. Badhwar, W. Wagner, A. D'Amore. American Association for Thoracic Surgery (AATS 2019) 2019 meeting, May 4-7, 2019 Toronto, Canada.
- [C. P. 1] G. N. Coyan, MD, A. D'Amore, Y. Matsumura, D. Pederson, S. K. Luketich, B. Kandala, V. Shanov, T.E. David, W. R. Wagner, V. Badhwar. *In Vivo* Functional Assessment of a Novel Bioinspired Scaffold-Based Tissue Engineered Heart Valve. American Association for Thoracic Surgery (AATS 2018) 2018 meeting: focus aortic symposium, April 27-28, 2018 New York NY.

## PUBBLICAZIONI

- [J.A.3] G. N. Coyan, 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. In press on J. of Thoracic and Cardiovascular Surgery, IF 4.46.
- [J.A.2] M. Murdock, J. Chang, S. Luketich, D. Pedersen, G. Hussey, A. D'Amore, S. Badyak. Cytocompatibility and mechanical properties of surgical sealants for cardiovascular applications. Journal of Thoracic and Cardiovascular Surgery, 2018, S0022-5223(18)32289-X. IF 4.46.
- [J.A.1] A. D'Amore, S. K. Luketich, G.M. Raffa, S. Olla, G. Menallo, A. Mazzola, F. D'Accardi, T.Grunberg, X. Gu, M. Pilato, M. V. Kameneva, V. Badhwar, W.R. Wagner. Heart valve scaffold fabrication: bioinspired control of macro-scale morphology, mechanics and micro-structure. Biomaterials 2018, 150, 25-37, 5Y-IF 8.97.

## PROPRIETÀ INTELLETTUALE

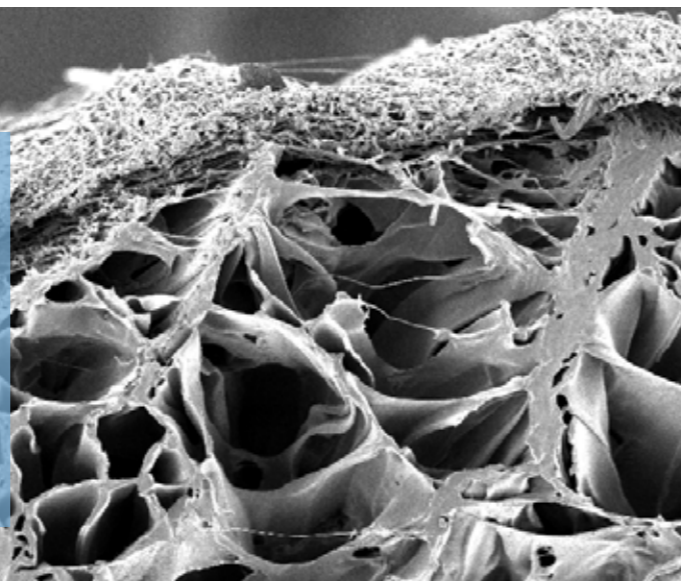
- [I. D. 6] Pitt invention disclosure filed on 09/2018, Pitt#04752, topic: biomedical device, title: "Valved stent for the treatment of severe tricuspid regurgitation."
- [I. D. 5] Pitt invention disclosure filed on 07/2018, Pitt#7715, topic: biomedical device, title: "Processing method and apparatus for micro-structured rope-like material.". Lead innovator/developer: A. D'Amore
- [I. D. 4] US provisional patent application 62/663,721 filed on 04/2018, topic: biomedical device, title: "Biodegradable metallic stent for heart valve tissue engineering". Lead innovator/developer: A. D'Amore
- [I. D. 3] US patent application PCT/US2018/022863 with WO (International publication number WO) published in 08/2018, topic: biomedical device, title: "Mandrel-less Electrospinning Processing Method and System, and Uses Therefor". Lead innovator/developer: A. D'Amore.
- [I. D. 2] US patent application PCT/US2018/017795 with WO (International publication number WO/2018/148646) published in 06/2018, topic: biomedical device, title: "Expandable percutaneous cannula". Lead innovator/developer: A. D'Amore.
- [I. D. 1] US patent application PCT/US2018/019358 with WO (International publication number WO/2018/156856) published in 08/2018, topic: biomedical device, title: "A stentless biopolymer heart valve replacement capable of living tissue regeneration". Lead innovator/developer: A. D'Amore.





# Vasi sanguigni ingegnerizzati (TEVG)

Antonio D'Amore, PhD  
adamore@fondazionerimed.com



## COLLABORAZIONI

Ospedale Cervello – Villa Sofia, Palermo, Italia  
University of Pittsburgh, U.S.A.  
University of Pittsburgh Medical Center, U.S.A.  
ATeN Center, Università di Palermo, Italia

## AREA TERAPEUTICA

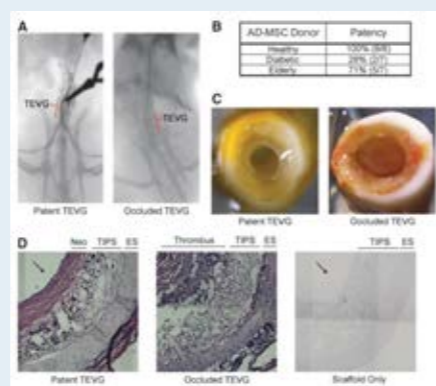
Insufficienze d'organo

## PIPELINE



## BREVE DESCRIZIONE

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 risteno 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*.



TEVG: Diabetic AD-MSCs do not produce patent vessels, whereas healthy and elderly do. (A) Angiograms were performed to assess the patency of TEVGs at the 8-week endpoint with a patent vessel showing clear flow past the graft to the hindquarters. (B) Total patency rate was calculated based on the number of patent versus total TEVGs; note that TEVGs created using cells from diabetic donors show a marked reduction in patency. (C) Gross inspection of the explants revealed that the primary reason for nonpatent TEVGs was occlusive thrombosis. (D) Hematoxylin and eosin-stained sections of a patent 8-week TEVG, a nonpatent 8-week TEVG, and a nonimplanted PEUU scaffold. Significant remodeling of patent TEVGs included newly developed neotissue (Neo) lumenally and breakdown of the original PEUU scaffolding material (inner layer: TIPS, outer layer: ES). Occluded grafts displayed the presence of a thrombus and no remodeling. Arrows indicate lumen in Figure 2D. ES, electrospun; PEUU, poly(ester urethane)urea; TEVGs, tissue-engineered vascular grafts; TIPS, thermally induced phase separation.

## IMPATTO

L'obiettivo 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 utilizzati, 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 applicazioni che possono beneficiare da progressi in questa tecnologia includono l'ingegnerizzazione dell'urettere o l'endotelizzazione delle cannule utilizzate da dispositivi di classe II e III.

## RISULTATI RAGGIUNTI NEL 2018

Completati due studi *in vivo* su ratto, valutata efficacia di vascular graft a doppio strato e seeding rapido "same day". Perfezionata tecnica di fabbricazione ed iniziata la sperimentazione su cavia di larga taglia. Prototipato vaso artificiale a tre strati riprodotto la struttura della tunica intima, media ed adventitia, protetta IP. Ipotizzato meccanismo per mitigare la iperplasia della tunica intima. Caratterizzate arterie coronarie native porcine. Mantenuto linea di fabbricazione di *scaffold* per NIH-R01 in collaborazione con il Dr Vorp.

## Fondi di ricerca ottenuti e/o gestiti

NIH 1R01 HL130077-01, Artificial Stem Cells for Vascular Tissue Engineering. PI: D. Vorp. University of Pittsburgh. Role: A. D'Amore collaborator, vascular graft fabrication;

## Premi conseguiti

(05/2018) *Honorable mention* nella categoria "Advanced manufacturing and materials" ai Carnegie Science Awards 2018.  
(09/2018) Vincitore a *ISSNAF Awards*, cerimonia che premia i migliori ricercatori italiani under 40 in USA e Canada; primo premio nella categoria "Franco Strazabosco Award" per l'ingegneria.  
(09/2018) Co-mentor di M. Solazzo, Politecnico di Milano, vincitore del premio "Franco Maria Montevicchi" per la migliore tesi MSc, conferita dal gruppo nazionale italiano di bioingegneria.

## Attività di docenza

(2017-2018) Mentor for BIOENG 1095 - Special projects. Individual research project under the guidance of a faculty member. Department of bioengineering, Univ. of Pittsburgh. Trainees: David Jacob Li-Ming, Armaan A. Fazal.

## Attività di tutoraggio

P. I. Gonzalez, 2017-present, University of Pittsburgh USA, biomimetic three-layers vascular graft;  
A. Fazal, 2017-present, University of Pittsburgh USA, biomimetic three-layers vascular graft;  
D. Jacob Li-Ming, 2016-present, University of Pittsburgh USA, biomimetic three-layers vascular graft;  
S. Luketich, 2013-present, University of Pittsburgh USA, support to the collaboration with Dr Vorp's Lab.

## OBIETTIVI PER IL 2019

L'obiettivo a lungo termine è la traslazione della tecnologia (Classe III FDA), gli obiettivi specifici per il 2019 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/bassatrombogenicità; riduzione della iperplasia intima;  
- 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.

## CONFERENZE

- [C. P. 4] D. Haskett, S. Madala, E. M. Cunnane, K. L. Lorentz, C. Zhang, S. K. Luketich, J. S. Weinbaum, A. D'Amore, L. E. Kokai, K. G. Marra, W. R. Wagner, J. Peter Rubin, D. A. Vorp. Development of a Seeding Device for Bulk-Seeding of Cells into a Long "Human-Sized" Scaffold for Tissue Engineered Vascular Grafting. 8th World congress on biomechanics, July 8-12, 2018 Dublino, Irlanda.
- [C. P. 3] K. Lorentz, J. Krawiec, D. Haskett, J. Weinbaum, M. Fedorchak, L. Bruk, A. Acharya, A. D'Amore, W. R. Wagner, S. Little, D. Vorp. Validating Microspheres for use in porous scaffolds. 8th World congress on biomechanics, July 8-12, 2018 Dublino, Irlanda.
- [C. P. 2] K. Lorentz, J. Krawiec, D. Haskett, J. Weinbaum, M. Fedorchak, A. D'Amore, W. R. Wagner, S. Little, D. Vorp. Validating Microspheres for Use in Porous Scaffolds. 8th World congress on biomechanics, July 8-12, 2018 Dublino, Irlanda.
- [C. P. 1] M. Sedlak, K. Lorentz, S. Luketich, S-H Ye, A. D'Amore, W. Wagner, J. Weinbaum, D. Vorp. Comparison of cell seeding quality of porous, biomimetic, tubular scaffolds for vascular tissue engineering fabricated by two different methods. Biomedical engineering society (BMES 2018), October 17-20, 2018, Atlanta Georgia.

## PUBBLICAZIONI

- [J. A. 3] T. K. Valencia-Rivero, J. C. Cruz, J. C. Briceño, A. D'Amore, S-H Ye, J. Vande Geest, W. R. Wagner. Decreased platelet deposition in SIS-based vascular grafts via covalent conjugation of RAFT polymers. 2018 IX International Seminar of Biomedical Engineering (SIB), 1-6, IF NA.
- [J. A. 2] D. G. Haskett, K. Saleh, J. T. Krawiec, J. S. Weinbaum, A. D'Amore, W. R. Wagner, L. E. Kokai, K. G. Marra, J. P. Rubin, D. A. Vorp. An Exploratory Study into the Preparation and Evaluation of a "Same Day" Adipose Stem Cell-Based TEVG. *Journal of Thoracic and Cardiovascular Surgery*, 2018;156:1814-22, IF 4.46.
- [J. A. 1] M. Murdock, J. Chang, S. Luketich, D. Pedersen, G. Hussey, A. D'Amore, S. Badyak. Cytocompatibility and mechanical properties of surgical sealants for cardiovascular applications. *Journal of Thoracic and Cardiovascular Surgery*, 2018, S0022-5223(18)32289-X. IF 4.46.

## PROPRIETÀ INTELLETTUALE

[I. D. 1] US patent application PCT/US2018/043889, filed on 07/2018, topic: biomedical device, title: "Multi-Layered Graft for Tissue Engineering Applications". Lead innovator/developer: A. D'Amore.



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

# Modelli osteocondrali 3D per lo studio di patologie degenerative e terapie in microgravità

Riccardo Gottardi, PhD  
rgottardi@fondazionerimed.com



## COLLABORAZIONI

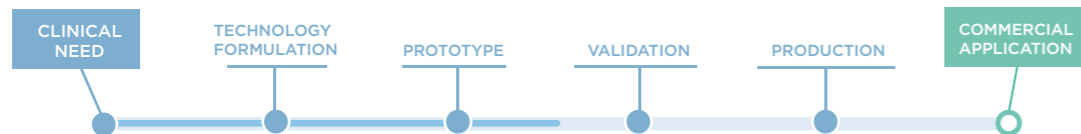
Università di Vanderbilt, Nashville, Tennessee, USA  
Bioserve, Boulder, Colorado, USA



## AREA TERAPEUTICA

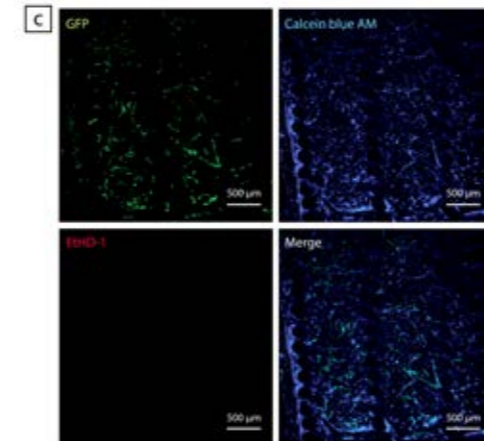
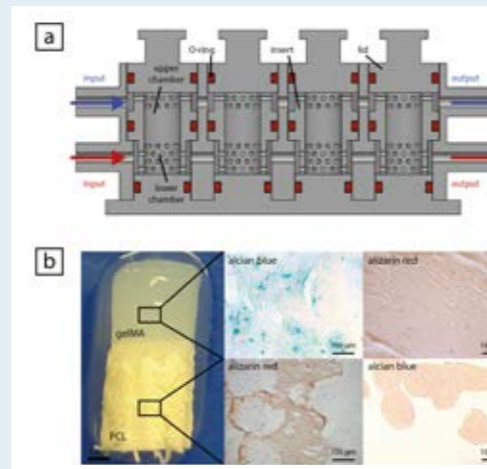
Patologie dell'invecchiamento

## PIPELINE



## BREVE DESCRIZIONE

I disturbi a carico dell'apparato scheletrico sono patologie importanti che gravano sulla popolazione e sono specificamente correlate alle condizioni di microgravità che si instaurano durante le missioni spaziali. Questo progetto ha avuto come obiettivo principale la realizzazione di un modello organoide 3D, finalizzato a studiare gli effetti della microgravità su tessuti osteocondrali e a testare farmaci e sviluppare terapie per il trattamento di patologie a carico di tessuti ossei e cartilaginei, che si sviluppano nello spazio, così come a terra. Abbiamo sfruttato il nostro già ampiamente validato bioreattore, congiuntamente ad avanzate tecnologie microfluidiche, per esaminare la risposta di tessuti osteocondrali, sia nativi sia ingegnerizzati. Abbiamo in programma di impiegare la Stazione Spaziale Orbitante come ambiente estremo per patologie quali osteoporosi e artrosi ed identificare così potenziali trattamenti che possano essere efficaci sia nello spazio sia, aspetto più importante, sulla terra.



a Cross-sectional bioreactor schematic. b Macroscopic and histological analysis of engineered osteochondral interface. c Live/dead staining of capillary-like network formed by HUVECs in bone compartment (GFP, green = HUVEC; Calcein Blue AM, blue = live cells; EthD-1, red = dead cells). gelMA gelatin methacrylate, PCL poly( $\epsilon$ -caprolactone), GFP green fluorescent protein, EthD-1 ethidium homodimer-1



Il nostro obiettivo a lungo termine è quello di sviluppare competenze nello studio di biologia, medicina, fisiologia e associata tossicologia nell'ambito all'apparato scheletrico, che combinino modelli organotipici ingegnerizzati con cellule staminali umane adulte e tecniche analitiche non invasive e in *real-time*. Un *organ-on-chip* basato su cellule staminali umane adulte può accelerare lo sviluppo di nuovi farmaci, riducendo il numero di composti che raggiungono la fase clinica I e II, e al contempo predicendo più accuratamente i risultati dei principi attivi che sono in fase di sperimentazione clinica. Ciò si traduce in una drastica riduzione dei costi di sviluppo di nuovi farmaci. Questa ricerca è essenziale per il Programma Spaziale ed il nostro approccio potrà essere utilizzato sia per analizzare gli effetti di stress ambientali multipli - quali assenza di gravità ed esposizione a radiazioni durante le missioni spaziali - sia per sviluppare terapie che possano contrastarne gli effetti. In questo modo possono essere generate e testate grandi coorti con minimi requisiti di peso, volume, costo e manutenzione, senza mettere a rischio la salute degli astronauti e il successo delle missioni. L'ambiente estremo dello spazio permette di generare in poche settimane un fenotipo della malattia che richiederebbe anni per svilupparsi sulla terra, un'opportunità unica per osservare lo sviluppo della malattia e per validare rapidamente l'efficacia di potenziali terapie.



## RISULTATI RAGGIUNTI NEL 2018

Abbiamo consolidato l'uso del nostro bioreattore bifasico per la coltura del tessuto osteocondrale e per lo sviluppo di costrutti osteocondrali vascularizzati. In particolare, abbiamo stabilito la rilevanza del nostro sistema nello studio della *cross-talk* tra i compartimenti cartilagineo ed osseo e la sua rilevanza nello studio dei disturbi e nella risposta ai trattamenti. Il bioreattore è fabbricato tramite stampa 3D, tecnica che consente un'enorme flessibilità nel soddisfare i requisiti sperimentali e nell'accogliere altri tessuti



## OBIETTIVI PER IL 2019

Questo progetto è stato finanziato da CASIS. Lo sviluppo preliminare a terra del sistema organoide all'interno del bioreattore, inclusi i suoi controlli microfluidici, è stato concluso nel 2018. La fase successiva includerà la validazione pre-volo e l'ottimizzazione del sistema insieme a tutti i test necessari per adattare i protocolli operativi all'uso sulla Stazione Spaziale Internazionale. Stiamo attualmente esplorando le opportunità di finanziamento per sostenere questa prossima fase, necessaria prima dell'implementazione sulla ISS. Nel frattempo, stiamo identificando potenziali molecole biologicamente attive che potrebbero essere testate all'interno del nostro sistema *in vitro*, valutando possibili interazioni tra tessuti. Ciò offrirà ulteriore convalida del sistema a supporto della sua commercializzazione.



## CONFERENZE

- American Institute of Chemical Engineers Annual Meeting, Ottobre 2018, Pittsburgh, PA, USA.
- Biomedical Engineering Society Annual Meeting, Ottobre 2018, Atlanta, GA, USA.
- Tissue Engineering and Regenerative Medicine International Society - World Annual Meeting, Settembre 2018, Kyoto, Japan.
- Society for Biomaterials, Aprile 2018, Atlanta, GA, USA.
- Orthopaedic Research Society Annual Meeting, Marzo 2018, New Orleans, LA, USA.
- European Orthopaedic Research Society Annual Meeting, Settembre 2018, Galway, Ireland



## PUBBLICAZIONI

- Pirosa A., Gottardi R., Alexander P.G., Tuan R.S., (2018), Engineering in vitro vascularized bone models for drug screening and predictive toxicology. *Stem Cell Research & Therapy*. 9: 112. DOI: 10.1186/s13287-018-0847-8.
- Nichols D.A., Sondh I.S., Little S.R., Zunino P., Gottardi R., (2018), Design and validation of an osteochondral bioreactor for the screening of treatments for osteoarthritis. *Biomedical Microdevices*. 2018, 20: 18. DOI: 10.1007/s10544-018-0264-x.



## PROPRIETÀ INTELLETTUALE

US20160201037A1, 22 Agosto 2014. Modular, microfluidic, mechanically active bioreactor for 3d, multi-tissue, tissue culture.



# R-CaRe – Riabilitazione per la Rigenerazione della Cartilagine

Riccardo Gottardi, PhD  
rgottardi@fondazionerimed.com

**COLLABORAZIONI**  
Orthopaedic Robotics Laboratory,  
Università di Pittsburgh, PA, USA

**AREA TERAPEUTICA**  
Patologie dell'invecchiamento



## 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-lesione. Infatti, circa il 25% delle microfratture richiede un re-intervento chirurgico entro 2 anni, con un'alta 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 mobilizzazione 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. Questo studio fornirà indicazioni per modificare gli attuali protocolli di riabilitazione 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 2018

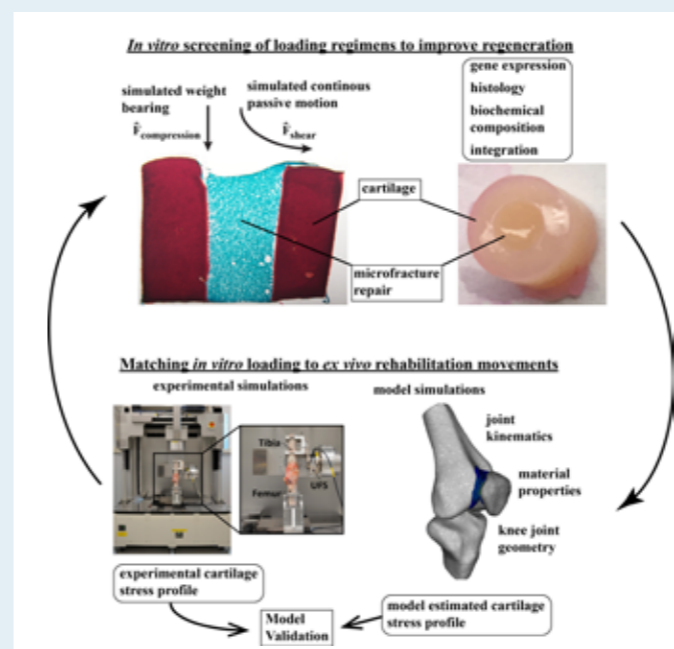
Abbiamo sviluppato un realistico modello *in vitro* di microfrattura per studiare gli effetti sulla condrogenesi del tessuto di riparazione formato in seguito ad intervento di microfrattura, sia del movimento passivo continuo sia del carico progressivo simulati attraverso specifici bioreattori. I nostri 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 2019

Nel 2019 miriamo a identificare se e come la meccanoattivazione 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

- American Institute of Chemical Engineers Annual Meeting, Ottobre 2018, Pittsburgh, PA, USA.
- Biomedical Engineering Society Annual Meeting, Ottobre 2018, Atlanta, GA, USA.
- Tissue Engineering and Regenerative Medicine International Society - World Annual Meeting, Settembre 2018, Kyoto, Japan.
- Society for Biomaterials, Aprile 2018, Atlanta, GA, USA.
- Orthopaedic Research Society Annual Meeting, Marzo 2018, New Orleans, LA, USA.
- European Orthopaedic Research Society Annual Meeting, Settembre 2018, Galway, Ireland

## PUBBLICAZIONI

Gottardi R., Stoddart M., (2018). Regenerative rehabilitation of the musculoskeletal system. *Journal of the American Academy of Orthopaedic Surgeons*. 26(15): e321-e323, DOI: 10.5435/JAAOS-D-18-00220



# Modellazione in-silico per la stratificazione del rischio clinico di patologie cardiovascolari

Salvatore Pasta, PhD  
spasta@fondazionerimed.com



## COLLABORAZIONI

Istituto mediterraneo per i trapianti e terapie ad alta specializzazione IRCCS- ISMETT, Italia  
McGowan Institute for Regenerative Medicine, University of Pittsburgh., U.S.A.  
CIS Centre for Biomedical and Healthcare Engineering, Ecole des Mines de Saint-Étienne, Francia  
Mayo Clinic, Rochester, USA  
Università di Palermo, Italia



## AREA TERAPEUTICA

Patologie dell'invecchiamento

## PIPELINE



## BREVE DESCRIZIONE

Le patologie cardiovascolari rappresentano ad oggi il principale fattore di mortalità in Italia e nei paesi europei a causa dell'invecchiamento generale della popolazione e dei cambiamenti di stile di vita. Vi è quindi la necessità di accoppiare i principi di biomeccanica ai progressi delle conoscenze mediche al fine di migliorare la nostra comprensione della patofisiologia delle

malattie cardiovascolari. Questo ha il potenziale di rivoluzionare il modo in cui diagnostichiamo, trattiamo e preveniamo le malattie cardiovascolari a beneficio sia dei pazienti che della società. L'applicazione della modellazione *in silico* può pertanto supportare il clinico nel processo clinico-decisionale riguardo l'intervento di patologie quali l'aneurisma aortico e lo scompenso cardiaco.

## IMPATTO

La modellazione *in silico* è in grado di predire la funzionalità di un organo e fornire in maniera non-invasiva ulteriori informazioni funzionali circa il progredire di una patologia cardiovascolare. Questo può determinare non solo un beneficio per il paziente che è spesso sottoposto a controlli invasivi ma anche una riallocazione delle risorse economiche per la diagnostica ed il monitoraggio clinico con conseguente beneficio per il sistema sanitario.



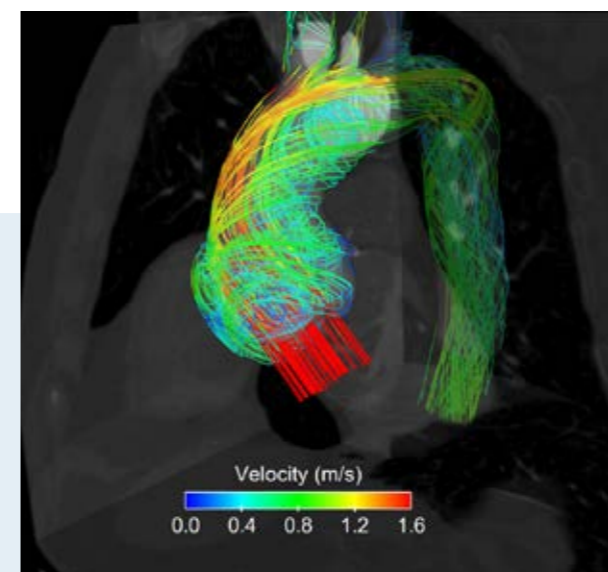
## RISULTATI RAGGIUNTI NEL 2018

Attualmente disponiamo di un database di modelli computazionali e metriche innovative che sono stati ottenuti da studi su oltre n.200 pazienti con patologie vascolari come l'aneurisma o la dissezione. In particolare, abbiamo dimostrato che il miR-34a costituisce un *biomarker* innovativo della capacità elastica dell'aorta patologica. Nel campo dei LVAD, abbiamo sviluppato un modello per la valutazione del rischio di scompenso destro nei pazienti in attesa di trapianto di cuore. È stato sviluppato un sensore PPG *wearable* per la misura di parametri vitali.



## OBIETTIVI PER IL 2019

L'obiettivo della presente ricerca è quello di sviluppare dei supporti clinico decisionali basati sulla modellazione computazionale per una migliore stratificazione del rischio clinico delle patologie cardiovascolari e di fornire nuovi strumenti predittivi che possono fornire ulteriori informazioni che non possono essere attualmente ottenute con i gold-standard clinici.



## CONFERENZE

- Di Giuseppe, M., S. Pasta, E. Bologna and M. Zingales (2018). Hereditariness of aortic tissue: In-vitro time-dependent failure of human and porcine specimens. RTSI 2018. Palermo.
- Pasta, S., M. Condipodero, V. Mendez, V. Agnese, D. Bellavia, G. Gentile, G. M. Raffa and G. Pilato (2018). Comparison of Hemodynamic and Structural Indices of Ascending Thoracic Aortic Aneurysm as predicted by 2-way FSI, CFD Rigid Wall Simulation and Displacement-Based FEA. WCB 2018. Palermo.
- Pasta, S., F. Scardulla, D. Bellavia, G. Gentile, G. M. Raffa and G. Pilato (2018). Hemodynamic of the celiac trunk in patients with a continuous-flow left ventricular assist device: in-silico and in-vitro flow analyses. WCB 2018. Palermo.
- Bellavia, D., V. Agnese, S. Pasta, R. GM, A. Iacovoni, M. Caputo, C. Fino, G. Romano, C. Minà, J. Maalouf, H. Michelena, F. Clemenza and G. Pilato (2018). Is Bicuspid Aortic Valve a Predictor of Faster Ascending Aorta Dilatation or Earlier Cardiac Surgery? A Longitudinal Long-Term Follow-Up Study Euro ECHO 2018. Palermo.
- Pasta, S., D. Bellavia, G. Gentile, G. M. Raffa and G. Pilato (2018). in silico computational modelling and circulating microrna signature of ascending thoracic aortic aneurysms. SICCH 2018. Roma.



## PUBBLICAZIONI

- Gallo, A., Agnese, V., Coronello, C., Raffa, G.M., Bellavia, D., Conaldi, P.G., Pilato, M., Pasta, S. On the prospect of serum exosomal miRNA profiling and protein biomarkers for the diagnosis of ascending aortic dilatation in patients with bicuspid and tricuspid aortic valve (2018) 273, pp. 230-236.
- Scardulla, F., Agnese, V., Romano, G., Di Gesaro, G., Sciacca, S., Bellavia, D., Clemenza, F., Pilato, M., Pasta, S. Modelling Right Ventricle Failure After Continuous Flow Left Ventricular Assist Device: A Biventricular Finite-Element and Lumped-Parameter Analysis. (2018) 9 (3), pp. 427-437.
- Mendez, V., Di Giuseppe, M., Pasta, S. Comparison of hemodynamic and structural indices of ascending thoracic aortic aneurysm as predicted by 2-way FSI, CFD rigid wall simulation and patient-specific displacement-based FEA (2018) 100, pp. 221-229.
- Falletta, C., Pasta, S., Raffa, G.M., Crinò, F., Sciacca, S., Clemenza, F. Peripheral Artery Disease and Continuous Flow Left Ventricle Assist Device: An Engaging Complement Analysis May Help to Guide Treatment (2018) 42 (7), pp. 756-759.
- Scardulla, F., Hu, S., D'Acquisto, L., Pasta, S., Barrett, L., Blanos, P., Yan, L. A novel multi-wavelength procedure for blood pressure estimation using opto-physiological sensor at peripheral arteries and capillaries



## PROPRIETÀ INTELLETTUALE

Pasta S. Scardulla C. Method and system for the evaluation of the risk of aortic rupture or dissection in an individual with an ascending thoracic aortic aneurysm. WO/2018/220573



# PIATTAFORME TECNOLOGICHE

Il motore di ricerca traslazionale della Fondazione Ri.MED prevede lo sviluppo di competenze e piattaforme tecnologiche a supporto dei progetti di *discovery* e sviluppo preclinico, sia per quanto riguarda approcci tradizionali di ricerca del farmaco, che per approcci di medicina rigenerativa ed immunoterapia.

La **piattaforma di Chimica computazionale** permette di effettuare studi di dinamica molecolare e di selezionare potenziali farmaci attraverso lo *screening in silico* di milioni di molecole sui bersagli terapeutici di interesse; è stata implementata anche l'infrastruttura chemo-informatica per l'analisi strutturata delle proprietà chimico-fisiche e delle disponibilità commerciali delle molecole. Di forte rilevanza per l'identificazione e validazione di nuovi bersagli terapeutici, nonché per l'analisi di dati di matrice biologica, è la **piattaforma di Bioinformatica** che utilizza *software open source*, ma anche applicazioni proprietarie.

La **piattaforma di Biofisica e Biologia strutturale** è dedicata alla produzione e purificazione e allo studio tridimensionale delle proteine di interesse, ed assume un ruolo fondamentale sia nello *screening* e nell'identificazione di *hit* e *lead*, che nello studio funzionale e patofisiologico delle proteine di interesse terapeutico. La **piattaforma di Bioingegneria computazionale** mira allo sviluppo di modelli predittivi basati su modelli di biomeccanica integrati con dati clinici e dati preclinici.

La **piattaforma di Proteomica** supporta l'identificazione di nuovi target farmacologici e di biomarcatori, nonché lo studio di potenziali effetti collaterali di particolari molecole terapeutiche. Durante il 2018 è stata definita la nuova **piattaforma di Magnetic Resonance Imaging**, che si avvale di due spettrometri a 3T e 7T, e di competenze per l'analisi di dati e immagini multimodali per la diagnosi predittiva di patologie e recidive.

Le piattaforme verranno ulteriormente potenziate durante il 2019 sia in termini di risorse umane che di strumentazioni, anche grazie a CheMIST, finanziamento regionale per la creazione di un laboratorio integrato di Drug Design, Biofisica e *Screening*.

Bioinformatica

---

Bioingegneria

---

Biologia strutturale e  
biofisica

---

Computer Aided Drug  
Design

---

Magnetic Resonance  
Imaging

---

Proteomica

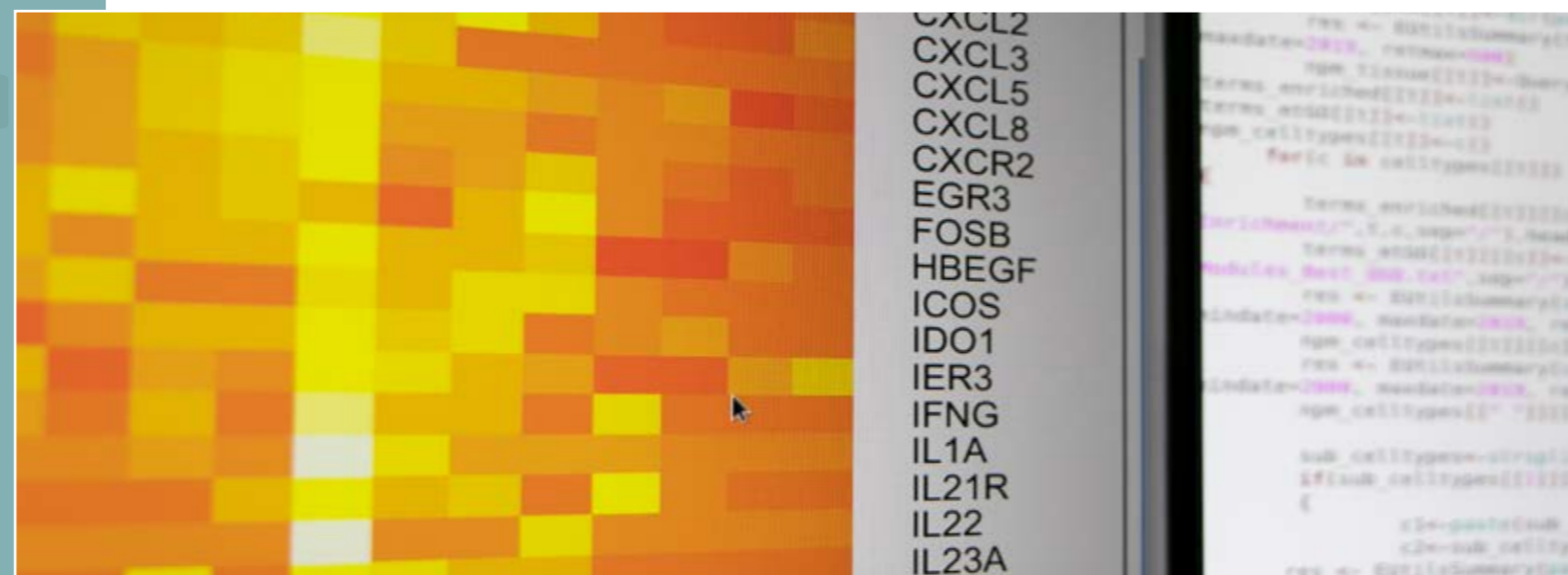
---

# Piattaforma di Bioinformatica

**CONTATTI:**  
Claudia Coronello, PhD  
ccoronello@fondazionerimed.com

Il gruppo di Bioinformatica 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. 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 per rispondere ad una specifica domanda biologica. In questi casi, sfruttiamo le nostre capacità di programmazione e gestione di *big data* per analizzare gli *high-throughput data* in maniera customizzata. 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. Il gruppo, a tal proposito, ha sviluppato nuovi algoritmi per l'analisi dei profili di espressione genica e delle reti di interazioni biologiche, ed è in procinto di renderli fruibili attraverso *web tool*.

**COLLABORAZIONI:**  
IBIM-CNR, Palermo, Italia  
Università degli Studi di Palermo, Italia  
University of Pittsburgh, U.S.A.



## Competenze

- 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. Siamo in procinto di realizzare *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 Workstations  
Server in HPC mode: 248 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

È 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 AGO2 e GW182. Siamo in procinto di estenderne l'applicazione ad un'altra proteina del complesso RISC, AGO1.

### DE.SSA (Differential expression by Single Samples Analysis)

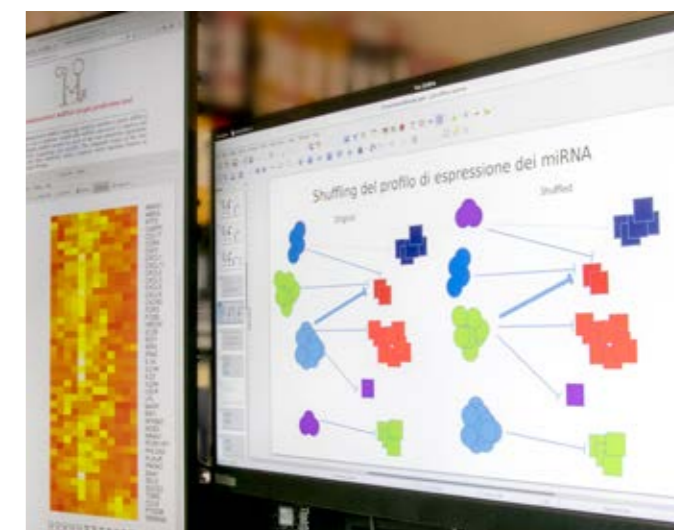
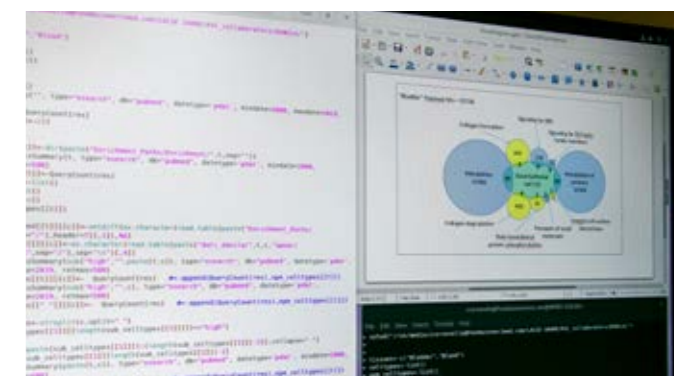
Stiamo sviluppando un algoritmo utile per individuare i geni differenzialmente espressi dal confronto di due singoli campioni, abolendo la necessità di realizzare repliche sperimentali. Al momento l'algoritmo è ottimizzato per individuare i geni differenzialmente espressi negli esperimenti di RIP-Chip, ma ci proponiamo di estenderlo ad altre applicazioni, come al confronto di due condizioni tissutali (es. tumorale vs normale).

## PUBBLICAZIONI

Perconti G, Contino F, Rubino P, Bivona S, Feo S, Giallongo A, Coronello C. (2018) AGO2 and GW182 IP show different characteristics in co-immunoprecipitated RNA features, BMC Bioinformatics, in stampa.

Iacovoni A, Bellavia D, Coronello C, Simon M, Link C, Falletta C, Romano G, Sciacca S, Di Gesaro G, Maalouf J, Pilato M, Gorcsan III J, Terzi A, Clemenza F (2018) Predicting Acute and Chronic Right Ventricular Failure in Patients Undergoing Left Ventricular Assist Device Implant: The Importance of Right Atrial Strain and Regional Deformation of the Right Ventricular Free Wall, The Journal of Heart and Lung Transplantation, 37 (4) Supplement <https://doi.org/10.1016/j.healun.2018.01.982>

Gallo A, Agnese V, Coronello C, Raffa GM, Bellavia D, Conaldi PG, Pilato M, Pasta S (2018) On the prospect of serum exosomal miRNA profiling and protein biomarkers for the diagnosis of ascending aortic dilatation in patients with bicuspid and tricuspid aortic valve, International Journal of Cardiology 273, 230-236, <https://doi.org/10.1016/j.ijcard.2018.10.005>.



# Piattaforma di Bioingegneria

**CONTATTI:**  
**Gaetano Burriesci, PhD**  
gburriesci@fondazionerimed.com

Le soluzioni biomediche innovative che Ri.MED è in grado di trasferire alla pratica clinica 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. La piattaforma tecnologica di bioingegneria 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, UK  
École Polytechnique Fédérale de Lausanne, Losanna, Svizzera  
Great Ormond Street Hospital for Children, Londra, UK  
IRCCS - ISMETT, Palermo, Italia  
Mines Saint Etienne, Francia  
Politecnico di Milano, Italia  
IRCCS Policlinico San Donato, Italia  
Università degli studi di Padova, Italia  
Università degli Studi di Palermo, Italia  
Université de Technologie de Compiègne, Francia  
University of Pittsburgh, U.S.A  
University College London, Londra, UK



## 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

L'unità di Bioingegneria sta mettendo in atto un profondo ampliamento della propria piattaforma tecnologica, equipaggiandola con le seguenti dotazioni:

- 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

Provaggi, E., Capelli, C., Rahmani, B., Burriesci, G., Kalaskar, D. M. (2018) 3D printing assisted finite element analysis for optimising the manufacturing parameters of a lumbar fusion cage. *Materials and Design*, <https://doi.org/10.1016/j.matdes.2018.107540>.

Gallo, A., Agnese, V., Coronello, C., Raffa, G.M., Bellavia, D., Conaldi, P.G., Pilato, M., Pasta, S. (2018) On the prospect of serum exosomal miRNA profiling and protein biomarkers for the diagnosis of ascending aortic dilatation in patients with bicuspid and tricuspid aortic valve. *International Journal of Cardiology* 273:230-236.

Tango, A.M., Salmons-Smith, J., Ducci, A., Burriesci, G. (2018) Validation and Extension of a Fluid-Structure Interaction Model of the Healthy Aortic Valve. *Cardiovascular Engineering and Technology* 9(4): 739-751.

Mendez, V., Di Giuseppe, M., Pasta, S. (2018) Comparison of hemodynamic and structural indices of ascending thoracic aortic aneurysm as predicted by 2-way FSI, CFD rigid wall simulation and patient-specific displacement-based FEA. *Computers in Biology and Medicine* 63:221-229.

Scardulla, F., Agnese, V., Romano, G., Di Gesaro, G., Sciacca, S., Bellavia, D., Clemenza, F., Pilato, M., Pasta, S. (2018) Modelling Right Ventricle Failure After Continuous Flow Left Ventricular Assist Device: A Biventricular Finite-Element and Lumped-Parameter Analysis. *Cardiovascular Engineering and Technology* 9(3):427-437.

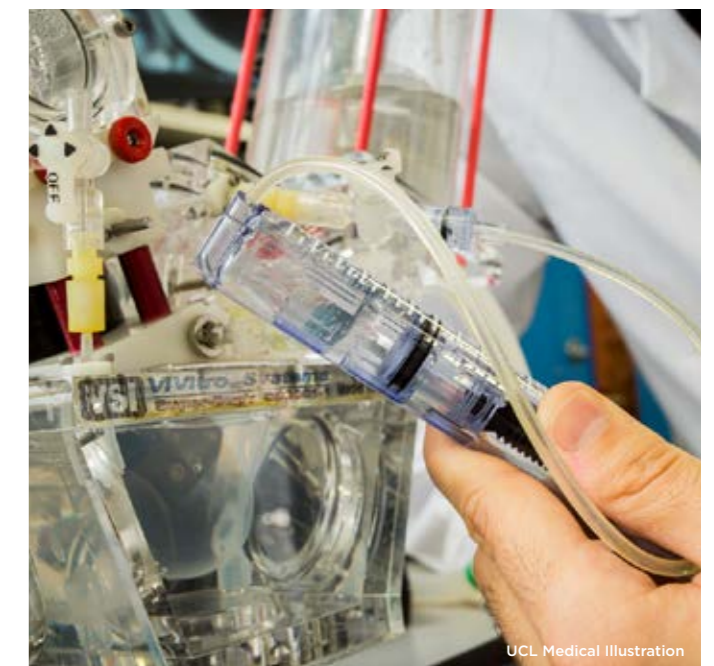
Bosi, G.M., Cook, A., Menezes, L., Schievano, S., Torii, R., Burriesci, G. (2018) Computational Fluid Dynamic Analysis of the Left Atrial Appendage to Predict Thrombosis Risk. *Frontiers in Cardiovascular Medicine* 5:34. doi: 10.3389/fcvm.2018.00034.

Falletta, G., Pasta, S., Raffa, G.M., Crino, F., Sciacca, S., Clemenza, F. (2018) Peripheral Artery Disease and Continuous Flow Left Ventricle Assist Device: An Engaging Complement Analysis May Help to Guide Treatment. *Artificial Organs* 42(7):756-759.

Scardulla, F., Hu, S., D'Acquisto, L., Pasta, S., Barrett, L., Blancs, P., Yan, L. (2018) A novel multi-wavelength procedure for blood pressure estimation using opto-physiological sensor at peripheral arteries and capillaries. *Proc. SPIE 10486, Design and Quality for Biomedical Technologies XI*, 1048614.

Maneas, E., Xia, W., Nikitichev, D., Daher, B., Manimaran, M., Wong, R.Y., Chang, C.W., Rahmani, B., Capelli, C., Schievano, S., Burriesci, G., Ourselin, S., David, A., Finlay, M., West, S., Vercauteren, T., Desjardins, A. (2018) Anatomically realistic ultrasound phantoms using gel wax with 3D printed moulds. *Physics in Medicine and Biology* 63:015033(10pp).

Couvreux, S., Nowacka, A., Biffi, B., Bruse, J., Burriesci, G., Taylor, A., Capelli, C., Schievano, S. (2018) Statistical shape analysis of the right ventricular outflow tract in patients with tetralogy of Fallot. *J Vasc Endovasc Therapy* 3:106.

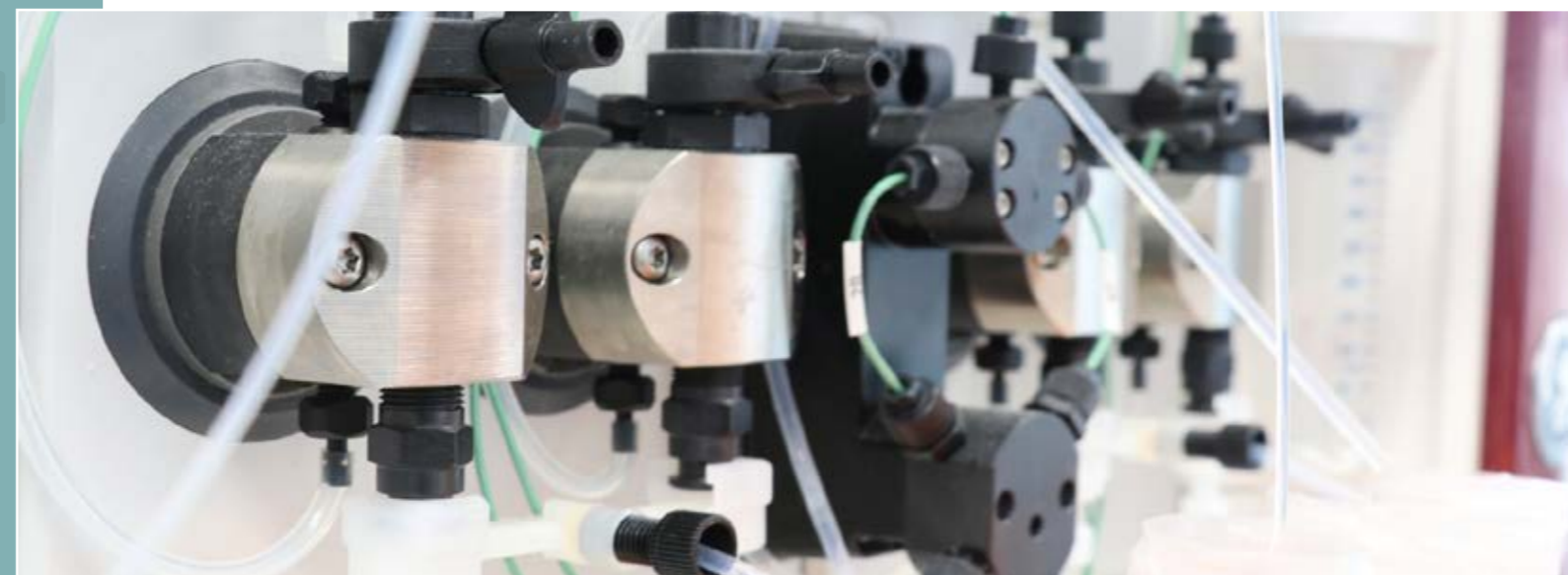


# Piattaforma di Biologia Strutturale e Biofisica

**CONTATTI:**  
Caterina Alfano, PhD  
calfano@fondazionerimed.com

Il gruppo di Biologia Strutturale e Biofisica mira a fornire informazioni biofisiche e strutturali dei fenomeni biologici guidati dal ripiegamento, aggregazione e interazione di proteine con il fine ultimo di comprendere i meccanismi molecolari alla base di determinate patologie. Il gruppo utilizza un approccio interdisciplinare che combina tecniche biofisiche all'avanguardia - quali la risonanza magnetica nucleare, la calorimetria, l'interferometria e la cristallografia a raggi X - completati da una consolidata competenza tecnica e metodologica in biologia molecolare e scienza delle proteine. L'utilizzo integrato di questa varietà di tecniche biofisiche e biochimiche ci consente la caratterizzazione delle proprietà intrinseche di proteine target, dei loro complessi e delle interazioni in cui sono coinvolte, guidandoci così nella comprensione di meccanismi molecolari alla base di serie patologie e nell'ideazione di possibili strategie di intervento.

**COLLABORAZIONI:**  
King's College London, UK  
Scuola Normale Superiore di Pisa, Italia  
Università degli Studi di Perugia, Italia  
Università degli studi della Campania Luigi Vanvitelli, Italia  
Università degli Studi di Palermo, Italia  
Istituto di Biofisica - CNR, Palermo, Italia



## Competenze

- Sviluppo di metodi per l'espressione e la purificazione di proteine ricombinanti;
- Determinazione delle dimensioni, della forma, del ripiegamento e della stabilità termodinamica di macromolecole;
- Identificazione di ligandi mediante *screening* e approccio structure-based, incluso fragment-based *screening* mediante NMR;
- Cinetica e proprietà termodinamiche delle interazioni;
- Saggi biochimici di attività

## Dotazione tecnologica

- Wet lab per clonaggio, espressione e purificazione di proteine ricombinanti;
- Octet Red96 - Bio-Layer Interferometry technology;
- MicroCal PEAQ-ITC Isothermal Titration Calorimeter;
- J-1500 Circular Dichroism Spectrophotometer;
- 800 MHz NMR spectrometer with cryogenically-cooled probe for <sup>1</sup>H/<sup>13</sup>C/<sup>15</sup>N multiple-resonance experiments;

## 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.
- Impatto del *crowding* molecolare nel *folding* di proteine

## PUBBLICAZIONI

Martínez-Lumbreras S\*, Alfano C\*, Kelly G., Atkinson R.A., Krysztofinska E.M., Flanagan K.A., Camp A.H. and Isaacson R.L. (2018) Solution structure of B. subtilis Sigma G inhibitor CsfB reveals a new fold. *Structure*, 26(4):640-648.

Pecci A., Ragab I., Bozzi V., De Rocco D., Barozzi S., Giangregorio T., Ali H., Melazzini F., Sallam M., Alfano C., Pastore A., Balduini C. and Savoia A. (2018) Thrombopoietin mutation in congenital amegakaryocytic thrombocytopenia treatable with romiplostim. *EMBO Molecular Medicine*, 10:63-75.

Zacco E., Graña-Montes R., Martin S.R., Sanchezde Groot N., Alfano C., Tartaglia G., Pastore A. (2019) RNA as a key factor in driving or preventing self-assembly of the TAR DNA-binding protein 43. *JMB*, doi: 10.1016/j.jmb.2019.01.028.





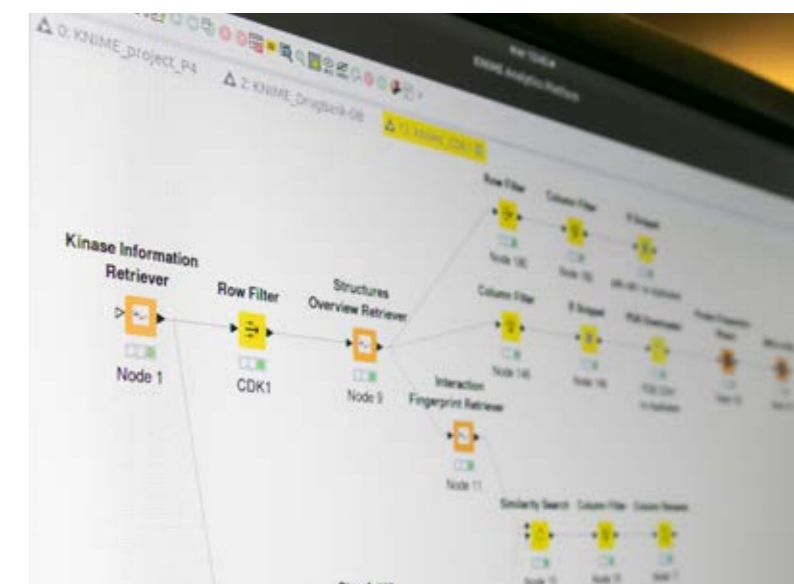
# Piattaforma di Computer Aided Drug Design

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 (VLS). 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-Throughput* (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  
Università di Pittsburgh, U.S.A.  
Università di Philadelphia, U.S.A.  
Università di Napoli Federico II, Italia  
IBIM-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

## 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)
- Gromacs
- RDKit
- KNIME

### Hardware

4 Workstation  
Server in HPC mode: 248 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: - 150 ns/giorno/scheda (su un sistema medio di 40,000 atomi)

## Piattaforma integrata *in silico*

Il gruppo sta attualmente lavorando alla realizzazione di una piattaforma integrata per lo studio dei network molecolari in collaborazione con il gruppo di bioinformatica.

## PROGETTI DI RICERCA ATTIVI

Il gruppo è attualmente coinvolto in diversi progetti focalizzati sulla ricerca di modulatori attivi nei seguenti target

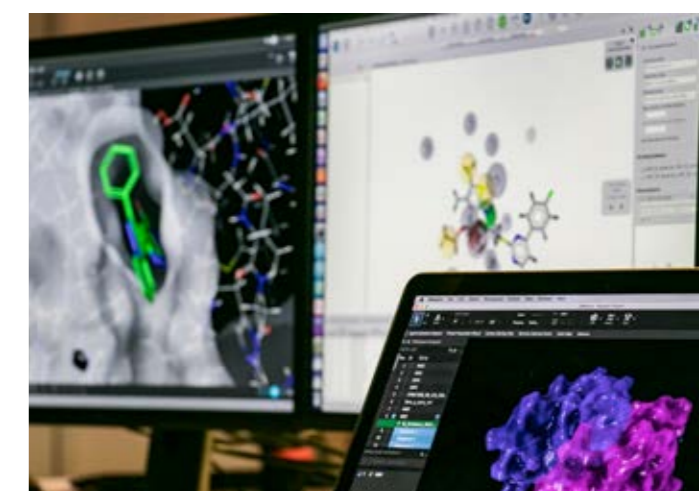
- Progettazione di inibitori selettivi del target **CD14** coinvolto nella maculopatia degenerativa legata all'età
- Progettazione di inibitori di **NLRP3** quale target della patologia infiammatoria
- Ricerca di modulatori di proteine coinvolte nella regolazione epigenetica della patologia tumorale (**SIRT1, KDM4, PDH1, 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** e **TOM20 / alfa-sinucleina**
- Studio di modulatori selettivi del recettore **CB1** mitocondriale
- Utilizzo di approcci chemogenomici per la ricerca di molecole attive nella patologia di **Huntington**
- Studio dei pathway di differenziamento condrocitico che coinvolgono **SMAD 2 e 3** e studio di molecole potenzialmente attive nell'induzione di questo processo.

## PUBBLICAZIONI

Perricone U., Gulotta M.R., Lombino 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

Perricone U., Wieder M., Seidel T., Langer T., Padova A., The use of Dynamic Pharmacophore in Computer Aided Hit Discovery: a case study, *Rational Drug Design: Methods and Protocols*, Springer (Book Chapter), 2018, DOI: 10.1007/978-1-4939-8630-9\_19

Gorska-Ponikowska M., Kuban-Jankowska A., Eisler S., Perricone U., Lo Bosco G., Barone G., Nussberger S., Mitochondrial biogenesis as a target for 2-methoxyestradiol in osteosarcoma cancer cells, *Cancer Genomics Proteomics*, 2018, DOI:10.21873/cgp.20067

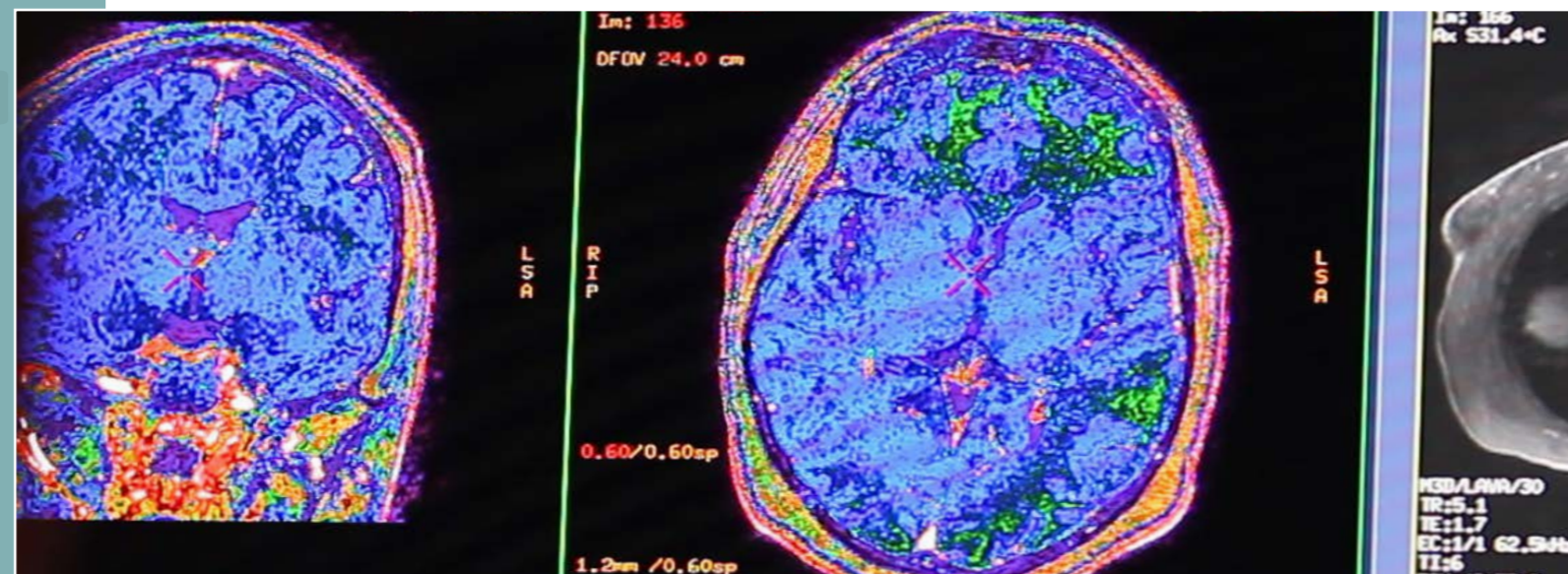


# Piattaforma di Magnetic Resonance Imaging

**CONTATTI:**  
Albert Comelli, PhD  
acomelli@fondazionerimed.com

La piattaforma di *Magnetic Resonance Imaging* (MRI) fornisce un importante supporto per facilitare la traduzione dei risultati scientifici in applicazioni cliniche, in particolare per la ricerca relativa a neuroscienze e cancro. Il gruppo, in prevista espansione, è attualmente composto da un veterinario, un fisico ed un informatico esperto in analisi ed elaborazioni di immagini e dati biomedicali ed è stato adeguatamente formato per acquisire ed analizzare immagini di risonanza magnetica in piccoli animali e sull'uomo, in collaborazione con gli enti che ospitano la strumentazione necessaria. In particolare, la piattaforma si avvale di due spettrometri, a 3T e 7T, acquisiti attraverso il progetto ISpeMi, e localizzati rispettivamente presso l'IRCCS ISMETT e l'Istituto Zooprofilattico Sperimentale. Nel corso del 2019 la piattaforma verrà arricchita con strumenti basati su tecnologie alternative (Bioluminescenza) o integrative (PET) per offrire un più ampio spettro di analisi di immagini *in vivo*.

**COLLABORAZIONI:**  
IRCCS - ISMETT, Palermo, Italia  
Istituto Zooprofilattico Sicilia (IZS), Palermo, Italia



## Competenze

- *Magnetic Resonance Imaging* (T1, T2, DP, DWI, ADC e DCE)
- Spettroscopia su *phantom*, *in-vivo* e *ex-vivo*
- Realizzazione di sistemi operatore indipendente per analisi, registrazione e segmentazione automatica e semi-automatica di immagini multimodali (MR/PET/CT e istologiche)
- Segmentazione e modellazione 3D di immagini biomedicali per la localizzazione, la diagnosi predittiva e il controllo volumetrico di patologie tumorali
- Tecniche intelligenti di analisi di dati e immagini multimodali per la diagnosi predittiva di patologie e recidive
- Progettazione e realizzazione di *phantom* per studi di spettroscopia e morfovolumetria

## Dotazione tecnologica

Presso l'Istituto Zooprofilattico Sperimentale:

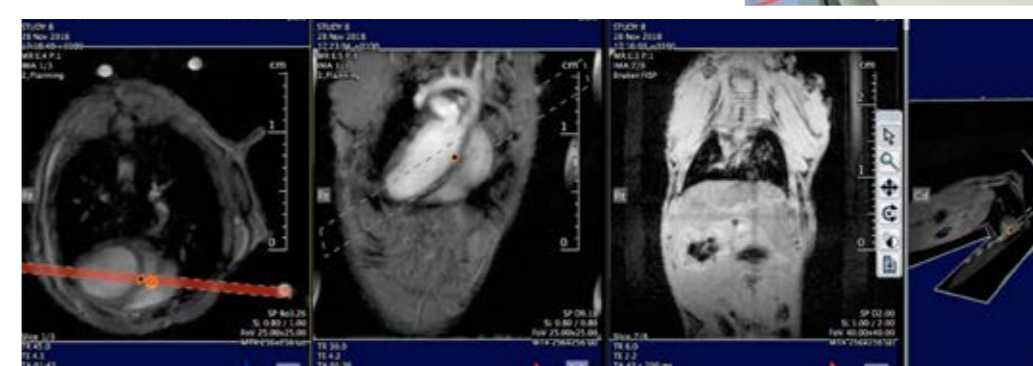
- Bruker Pharmascan 70/16 (7 Tesla).  
Bobine disponibili:
  - Mouse and rat brain 2x2 receive surface array coils
  - Mouse and rat transmit-receive volume coil (40 mm diametro interno e 75 mm diametro esterno)
  - Rat body 8x2 transmit volume array coil (72 mm diametro interno e 89 mm diametro esterno)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

Presso IRCCS ISMETT:

GE DISCOVERY MR 750 W 3 Tesla  
Nuovo sistema di diagnostica per Risonanza Magnetica ad alto campo 3.0 T, destinato all'analisi del corpo intero con la massima efficacia clinica che si pone nel segmento di eccellenza dei sistemi a 3.0 T. Consente, grazie ad un potenziato hardware e ad una nuovissima interfaccia utente, di esplorare nuove frontiere su tutti i campi di applicazioni cliniche avanzate (neuro, body, mammella, angio, osteoarticolare, cardio, etc.).

## 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.



# Piattaforma di Proteomica

## CONTATTI:

Simone Dario Scilabra, PhD  
sdscilabra@fondazionerimed.com

Il proteoma è l'insieme di proteine che viene espresso da una cellula, un tessuto o un organismo. L'analisi sistematica ad elevata capacità di un proteoma, nota come proteomica, consente l'identificazione di proteine e della loro espressione all'interno di campioni biologici. Inoltre, la proteomica consente di quantificare l'espressione differenziale di una data proteina all'interno di due o più campioni biologici. L'ipotesi "un gene - una proteina" che rivoluzionò la biologia molecolare a metà del secolo scorso, al giorno d'oggi è chiaramente superata. Infatti, nel proteoma umano sono state identificate più di 90.000 proteine diverse rispetto ai 20.000 geni espressi dal genoma. Per questo motivo, persino rispetto ai metodi più avanzati di genomica e trascrittomica, la proteomica presenta indubbi vantaggi per l'analisi di tutte quelle proteine che sono soggette a modifiche post-traduzionali. Nell'ultimo decennio la proteomica si è imposta come tecnologia d'elezione per lo studio di proteine su larga scala, con numerose applicazioni sia nella ricerca preclinica che clinica. Tali applicazioni vanno dall'identificazione di nuovi target farmacologici, all'identificazione di biomarcatori fino allo studio di potenziali effetti collaterali di particolari molecole terapeutiche.



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.

## 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
- Arricchimento del fosopeptide (PTM)
- Spettrometria di massa con marcatura SILAC
- Spettrometria di massa con marcatura TMT
- Proteomica quantitativa LFQ
- Western Blot
- SDS-PAGE

## Dotazione tecnologica

### Hardware

- 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

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, ed 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 esterni (Università, CNR). Così facendo, miriamo a diventare un punto di riferimento per l'intera ricerca scientifica nell'area.

## PROGETTI DI RICERCA

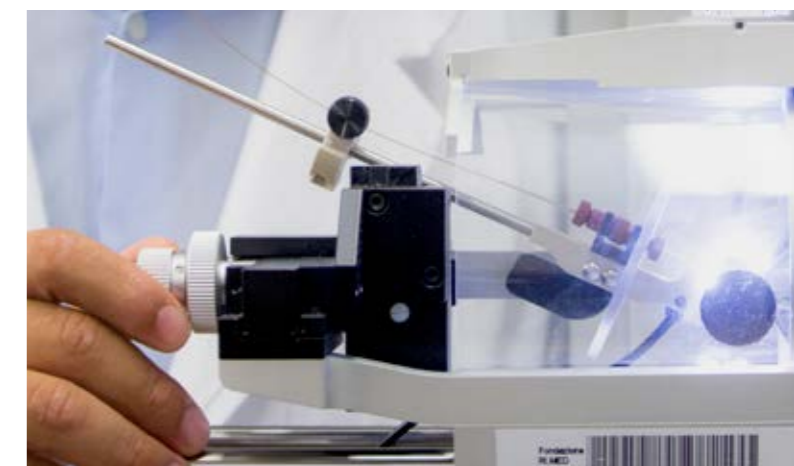
**Identificazione di nuovi substrati di ADAM17:** ADAM17 è un membro delle disintegrin metalloproteasi che svolge un ruolo chiave nello sviluppo e nell'infiammazione. Utilizzeremo metodi all'avanguardia di proteomica per identificare nuovi substrati di ADAM17, e quindi nuovi meccanismi patofisiologici nei quali ADAM17 potrebbe essere coinvolta.

**Analisi della selettività dei substrati di ADAM17 mediata dagli iRhom.** iRhom1 e iRhom2, sono stati identificati come principali regolatori dell'attività di ADAM17, essendo in grado di mediare la maturazione di ADAM17 e di dirigere la sua attività catalitica verso specifici gruppi di proteine. Utilizzeremo analisi del secretoma per identificare substrati di ADAM17 il cui rilascio è specificamente mediato da iRhom1 o da iRhom2.

## PUBBLICAZIONI

Scilabra S.D., Pignoni 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*, in press



# 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 quindi 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 sottoporre 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 sono proseguite le attività relative ai cinque progetti finanziati nel 2017; il 2018 ha inoltre riscosso il positivo risultato dell'ammissione a finanziamento di tre nuovi progetti, di cui due a valere sul Programma Operativo Nazionale per la ricerca finanziato dal MIUR e uno finanziato dalla Regione Siciliana all'interno del Piano di Attività Trasferimenti per metodologie innovative nel campo delle biotecnologie. Tra le attività del 2018 va segnalata la sottomissione di tre progetti a valere sul finanziamento Patto per il SUD, tre progetti europei - due sul bando Innovative Medicine Initiative e uno sul bando Marie Curie Skłodowska per l'azione *Innovative Training Networks* - e dodici proposte per Dottorati di ricerca innovativi a caratterizzazione industriale.



## Progetti scientifici in corso di svolgimento nel 2018

**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.

## Progetti scientifici ammessi a finanziamento nel 2018

**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.

**4FRAILTY**  
Sensoristica intelligente, infrastrutture e modelli gestionali per la sicurezza di soggetti fragili  
Finanziato da: Ministero della Salute nell'ambito del Programma di Ricerca Finalizzata 2013

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 attività "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 sottomessi nel 2018

### AIM

#### Artificial Intelligence for Medicine - AIM

**Bando: Patto per il Sud Sicilia (fondi CIPE) di pertinenza dell'Assessorato Regionale delle Attività Produttive**

Il progetto ha due obiettivi: Creazione e potenziamento di laboratori d'intelligenza artificiale computerizzata per la ricerca e sviluppo di medicina traslazionale e personalizzata (Laboratorio AIM); Creazione di un Centro di Intelligence, Valorizzazione di brevetti e Trasferimento Tecnologico a favore del Settore Life Science della Regione Siciliana, incluso un Incubatore d'Impresa e Open Science Lab per la formazione di studenti della scuola primaria e secondaria della Regione Siciliana e laureandi delle Università siciliane.

### DEVELOP

**Bando: Patto per il Sud Sicilia (fondi CIPE) di pertinenza dell'Assessorato Regionale delle Attività Produttive**

Il progetto ha due obiettivi: 1) Creazione di un Centro di Sintesi e Ricerca Preclinica e Sviluppo di Prodotti Life Science (farmaci innovativi, biomarcatori e prodotti biomedicali) per la caratterizzazione tossicologia, farmaceutica inclusi laboratori con certificazioni Good Laboratory Practice (GLP) e Good Manufacturing Practice (GMP); 2) Potenziamento Consorzio ISPeMI. Manutenzione e potenziamento del Laboratorio di Ricerca Preclinica basato sulle *facilities* del Consorzio ISPeMI presso l'Istituto Zootechnico e l'Istituto Zooprofilattico per studi di proof of concept preclinico tramite piattaforma di *imaging in vivo*, di bioluminescenza, di tossicologia, di bio-analitica, etc.

### SICILY INSTITUTE FOR HEALTH

**Bando: Patto per il Sud Sicilia (fondi CIPE) di pertinenza dell'Assessorato Regionale delle Attività Produttive**

L'obiettivo strategico del progetto è lo sviluppo in Sicilia, in provincia di Palermo e di Trapani, di due centri avanzati e integrati di medicina preventiva. Il Centro di Prevenzione e della Cura delle Malattie Croniche Non-Trasmissibili offrirà servizi di ricerca e diagnostica per la prevenzione e la cura delle malattie croniche non trasmissibili - MCNT- (epato-bilio-pancreatiche e gastrointestinali, dell'apparato cardiovascolare, diabete e sindrome metabolica, malattie oncologiche).

### DEVENET

**Development of Technologies for the Design of Light-Responsive Molecular Systems for Retinal Diseases**

**Bando: H2020-MSCA-ITN-2018**

Progetto di formazione europeo per lo sviluppo di approcci combinati farmacologici/genetici per migliorare e ripristinare la visione nelle malattie della retina ed in particolare nella retinite pigmentosa.

### INNODRUG

**Federated and privacy preserving for machine learning for INNOVATIVE DRUG discovery**

**Bando: Innovative Medicine Initiative (IMI2) TOPIC 3**

L'obiettivo del progetto è di sviluppare una strategia all'avanguardia, potente e flessibile e una piattaforma tecnologica per la condivisione di modelli di apprendimento automatico federati in grado di tutelare la privacy.

**Principal Investigator: U. Perricone**

**Generazione e attività immunoregolatoria di keto-derivati di acidi grassi polinsaturi (PUFA) prodotti dall'enzima 15-idrossiprostaglandina deidrogenasi (15-PGDH) in versamenti pleurici maligni di pazienti con tumore polmonare.**

**Bando: Roche per la ricerca 2018**

L'obiettivo del progetto è di testare l'ipotesi che alterazioni dell'asse enzimatico Cox-2/15-PGDH/PTGR2 e del relativo profilo metabolico in versamenti pleurici maligni di pazienti con tumore polmonare contribuiscano alla disregolazione immunitaria.

**Principal Investigator: C. Cipollina**

## PhD innovativi attivati nel 2018

**Networks from Biological Big Data: analysis of the sample specific miRNome**

Università promotrice: Università degli Studi di Palermo

Università estera: Università di Pittsburgh

Soggetto industriale: UPMC Italy

**Tutor aziendale: Claudia Coronello**

**Sviluppo di farmaci attivi nella terapia a bersaglio molecolare**

Università promotrice: Università degli Studi di Messina

Università estera: Università di Vienna

Soggetto industriale: Sterling

**Tutor aziendale: Alessandro Padova**

**Progettazione e sintesi di molecole attive nel controllo epigenetico della patologia tumorale**

Università promotrice: Università degli Studi di Palermo

Università estera: Università di Vienna

Soggetto industriale: UPMC Italy

**Tutor aziendale: Alessandro Padova**

**Tecniche di *knowledge management* per la federazione e interrogazione di grandi banche dati distribuite a supporto della progettazione farmaceutiche**

Università promotrice: Università degli Studi di Palermo

Università estera: Università di Vienna

Soggetto industriale: QWINCE LTD

**Tutor aziendale: Ugo Perricone**

**Modeling micromeccanico delle patologie aortiche**

Università promotrice: Università degli Studi di Palermo

Università estera: Ecole Mines Saint Etienne

Soggetto industriale: UPMC Italy

**Tutor aziendale: Salvatore Pasta**

## PhD innovativi sottomessi nel 2018

### Progettazione di inibitori del complesso proteico CDK1/ CiclinaB1 come agenti terapeutici chemioterapici

Università promotrice: Università degli Studi di Palermo  
Università estera: Università di Amsterdam  
Soggetto industriale: UPMC Italy  
**Tutor aziendale: Ugo Perricone**

### Progettazione di inibitori delle Tirosina Chinasi come agenti terapeutici chemioterapici

Università promotrice: Università degli Studi di Palermo  
Università estera: Università di Amsterdam  
Soggetto industriale: UPMC Italy  
**Tutor aziendale: Ugo Perricone**

### Uso di tecniche di Machine Learning Federato nel processo di Drug Discovery

Università promotrice: Università degli Studi di Palermo  
Università estera: Università di Vienna  
Soggetto industriale: Italtel  
**Tutor aziendale: Ugo Perricone**

### Modelli a parametri concentrati per patologie cardiache

Università promotrice: Università degli Studi di Palermo  
Università estera: École polytechnique fédérale de  
Lausanne  
Soggetto industriale: UPMC Italy  
**Tutor aziendale: Salvatore Pasta**

### Ruolo dell'interazione tra alfa-sinucleina e membrane cellulari nel morbo di Parkinson: analisi biofisica in-vitro ed in cellula dei meccanismi molecolari

Università promotrice: Università degli Studi di Palermo  
Università estera: Institute for Neurodegenerative Diseases -  
University of Pittsburgh - USA  
Soggetto industriale: UPMC Italy  
**Tutor aziendale: Caterina Alfano**

### Analisi biomeccanica dell'appendice atriale sinistra per la prevenzione di eventi tromboembolici

Università promotrice: Università degli Studi di Palermo  
Università estera: University College London, Regno Unito  
Soggetto industriale: UPMC Italy  
**Tutor aziendale: Gaetano Burriesci**

### Modelli computazionali per l'analisi e la classificazione dei parametri morfologici ed emodinamici della appendice atriale sinistra

Università promotrice: Università degli Studi di Palermo  
Università estera: UCL - University College London  
Soggetto industriale: UPMC Italy  
**Tutor aziendale: Claudia Coronello**

### Messa a punto di saggi cellulari High Throughput Screening per lo sviluppo di inibitori di NLRP3 e test su modelli sperimentali di patologie infiammatorie croniche

Università promotrice: Università degli Studi di Palermo  
Università estera: University College London, Regno Unito  
Soggetto industriale: Institut de la Vision, Paris  
**Tutor aziendale: Chiara Cipollina**

### Studio di peptidi e peptidomimetici come modulatori delle interazioni proteina-proteina nelle patologie oncologiche e neurodegenerative.

Università promotrice: Università degli Studi di Palermo  
Università estera: Università di Dundee  
Soggetto industriale: Sterling  
**Tutor aziendale: Alessandro Padova**

### Cellule dendritiche tollerogeniche derivate dal midollo osseo e residenti per la promozione di una tolleranza operativa nel trapianto di fegato

Università promotrice: Università degli Studi di Messina  
Università estera: CEMIR, Trondheim, Norvegia  
Soggetto industriale: UPMC Italy  
**Tutor aziendale: Ester Badami**

### Sviluppo di una nuova immunoterapia contro Klebsiella pneumoniae basata su lieviti probiotici Saccharomyces cerevisiae geneticamente ingegnerizzati

Università promotrice: Università degli Studi di Messina  
Università estera: CEMIR, Trondheim, Norvegia  
Soggetto industriale: UPMC Italy  
**Tutor aziendale: Bruno Douradinha**

### Interazione tra disfunzione mitocondriale e riprogrammazione del ciclo cellulare neuronale: rilevanza nei processi degenerativi correlati alla demenza di Alzheimer e al Morbo di Parkinson

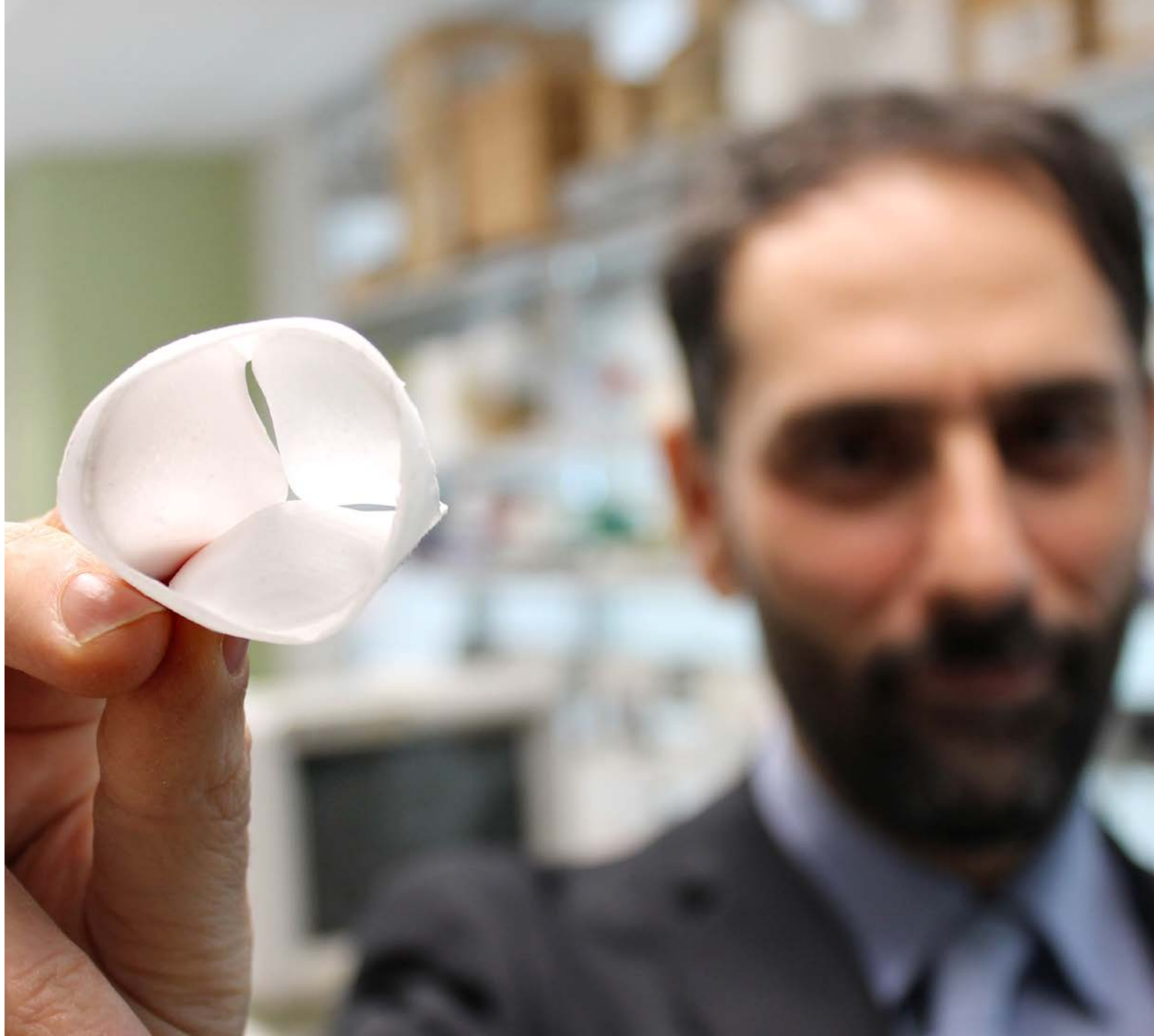
Università promotrice: Università degli Studi di Catania  
Università estera: Institute for Neurodegenerative Diseases -  
University of Pittsburgh  
Soggetto industriale: UPMC Italy  
**Tutor aziendale: Roberto Di Maio**

# 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, nel 2017 è stata costituita l'area "IP&TT" (Proprietà Intellettuale e Trasferimento Tecnologico), allo scopo di 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.

Grazie alla capacità di dialogare con università ed enti di ricerca da una parte e con aziende farmaceutiche e biotecnologiche dall'altra, l'Area "IP&TT" lavora per sviluppare programmi di collaborazione finalizzati allo sviluppo di tecnologie abilitanti e nuove soluzioni per il miglioramento della salute e della qualità di vita dei pazienti.







## Portfolio Brevetti al 31.12.2018

### SVILUPPO DI NUOVI FARMACI

**Nitro-oleic acid (NO<sub>2</sub>-OA) controlled release platform to induce regional angiogenesis in abdominal wall repair.**  
Fondazione Ri.MED - Università di Pittsburgh

**Novel nitro-nitrate-lipid intermediates that mediate nitrosating and alkylating reactions.**  
Fondazione Ri.MED - Università di Pittsburgh

### MEDICINA RIGENERATIVA E IMMUNOTERAPIA

**NK-mediated immunotherapy and uses thereof.**  
Fondazione Ri.MED - IRCCS ISMETT

**Probiotic yeasts as novel vaccination vectors.**  
Fondazione Ri.MED - IRCCS ISMETT

**Mandrel-less electrospinning processing method and electrodes for bio-mimetic tendinous tissue engineering.**  
Fondazione Ri.MED - Università di Pittsburgh

### INGEGNERIA DEI TESSUTI E DISPOSITIVI BIOMEDICALI

**Method and system for the evaluation of the risk of an ascending thoracic aortic aneurysm.**  
Fondazione Ri.MED - IRCCS ISMETT

**Trans-atrial access for transcatheter valve repair or replacement.**  
Fondazione Ri.MED - Università di Pittsburgh

**Bi-layer Polyurethane - Extra Cellular Matrix Scaffolds for Improved Ischemic Ventricular Wall Remodeling.**  
Fondazione Ri.MED - Università di Pittsburgh

**A double components mandrel for electrospun stentless, multi-leaflet valves fabrication.**  
Fondazione Ri.MED - Università di Pittsburgh

**A Retrievable Self-expanding Non-thrombogenic Low-profile Percutaneous Tricuspid Valve Prosthesis.**  
Fondazione Ri.MED - Università di Pittsburgh

**A Method to Characterize the Complete Fiber Network Topology of Planar Fibrous Tissues and Scaffolds.**  
Fondazione Ri.MED - Università di Pittsburgh

**Three-layered, bio-inspired, small-diameter vascular graft for tissue engineering applications.**  
Fondazione Ri.MED - Università di Pittsburgh

**A microfluidic device for the optical monitoring of high throughput 3D single and multi-tissue microsystems during development, response to stress and to treatments.**  
Fondazione Ri.MED - Università di Pittsburgh

**Prevention of soft tissue ossification by controlled release.**  
Fondazione Ri.MED - Università di Pittsburgh

**A modular, microfluidic, mechanically active bioreactor for 3D, multi-tissue, tissue culture.**  
Fondazione Ri.MED - Università di Pittsburgh

**Recruitment of mesenchymal stem cells using controlled release systems.**  
Fondazione Ri.MED - Università di Pittsburgh

**Polyvinylpyrrolidone and Stearic acid coated Cranberry Extract for the Prevention of Dental Biofilm.**  
Fondazione Ri.MED - Università di Pittsburgh

**An organ chip to model mammalian joint.**  
Fondazione Ri.MED - Università di Pittsburgh

**High throughput mechanical activation device.**  
Fondazione Ri.MED - Università di Pittsburgh

**Ethyl lauroyl arginate and Stearic acid coated Cranberry Extract for the Prevention of Dental Biofilm.**  
Fondazione Ri.MED - Università di Pittsburgh

**Enhancing cranberry extract residence time on biofilm and pellicle-2.**  
Fondazione Ri.MED - Università di Pittsburgh

**A Stentless Biopolymer Heart Valve Replacement Capable of Living Tissue Regeneration.**  
Fondazione Ri.MED - Università di Pittsburgh

**An Expandable Percutaneous Venous Cannula for Use in Extracorporeal Cardiopulmonary Support.**  
Fondazione Ri.MED - Università di Pittsburgh

**Semi-rigid annuloplasty ring and method of fabrication**  
Fondazione Ri.MED

PROGETTO GRAFICO E CONTENUTI EDITORIALI  
Ufficio Comunicazione & Marketing Fondazione Ri.MED  
[communication@fondazionerimed.com](mailto:communication@fondazionerimed.com)

Stampato da Officine Grafiche soc. coop., Palermo  
Febbraio 2019



Via Bandiera, 11 - 90133 Palermo, Italy  
Tel. +39 091 6041111 - [info@fondazionerimed.com](mailto:info@fondazionerimed.com)  
[www.fondazionerimed.com](http://www.fondazionerimed.com)