

REPORT SCIENTIFICO 2017

-  SCOPERTA DI NUOVI FARMACI
-  MEDICINA RIGENERATIVA E IMMUNOTERAPIA
-  INGEGNERIA DEI TESSUTI E DISPOSITIVI BIOMEDICALI
-  PIATTAFORME TECNOLOGICHE

● SOCI FONDATORI



● PARTNER





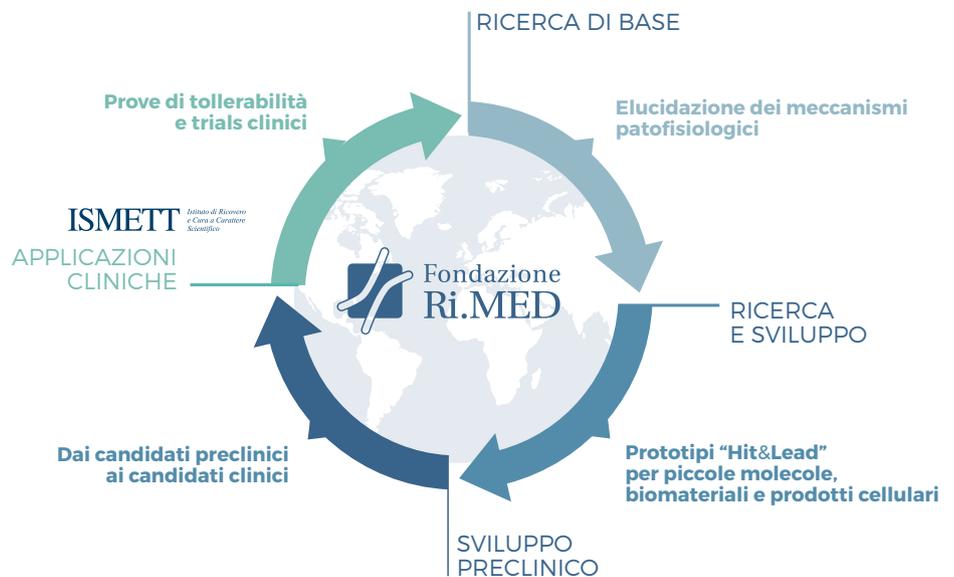
Alessandro Padova
DIRETTORE GENERALE

La Fondazione ha come proprie missioni statutarie lo sviluppo di approcci di ricerca biotecnologica e biomedica, finalizzata a trasferire terapie innovative al paziente, la divulgazione del sapere scientifico e la formazione di personale altamente qualificato nel settore Life Science.

Gli approcci di ricerca traslazionale di Ri.MED si snodano su tre matrici principali: l'ingegnerizzazione di tessuti e la bioingegneria, la ricerca e sviluppo del farmaco e di immunoterapie e la medicina rigenerativa.

L'attività di ricerca di drug discovery e preclinica trova spazio e forza nella sempre più ampia rete di collaborazioni e convenzioni scientifiche che Ri.MED sviluppa con enti e istituzioni di settore: sono già operativi accordi di ricerca e sviluppo preclinico, di promozione dell'attività di ricerca e condivisione di laboratori e risorse con enti a livello regionale, nazionale, europeo e mondiale.

RICERCA TRASLAZIONALE



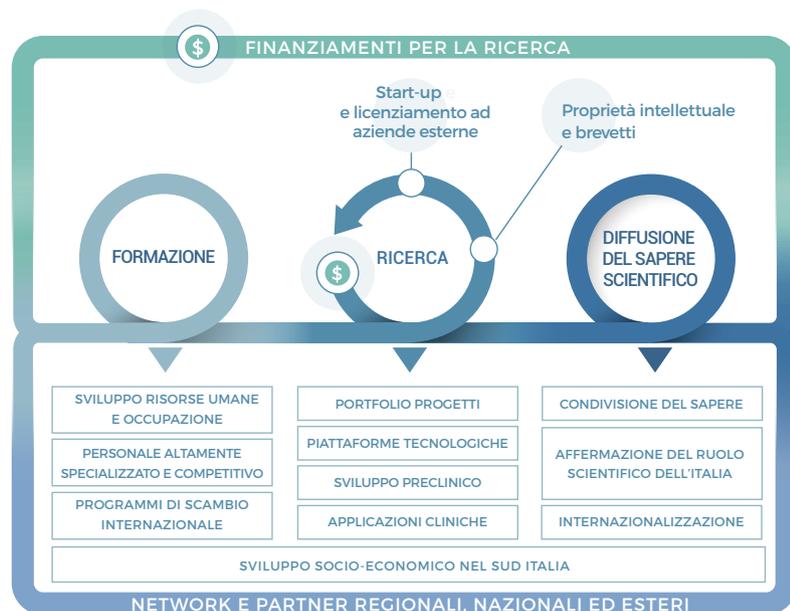
Obiettivo delle collaborazioni è integrare competenze complementari a progetti di ricerca traslazionale congiunti, aumentandone la massa critica e le potenzialità di successo. Fondamentale inoltre è la capacità di creare network in grado di competere a livello regionale, nazionale e comunitario al finanziamento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

Nell'ambito della ricerca preclinica e clinica, sono strategiche le partnership con l'Università di Pittsburgh, UPMC e l'IRCCS-ISMETT, che hanno portato allo sviluppo di decine di brevetti. La generazione di proprietà intellettuale rappresenta un valore intangibile fondamentale nel bilancio della Fondazione Ri.MED, nell'ottica di sviluppare un innovativo modello di sostenibilità della ricerca. Alcune di queste invenzioni, oggi in fase di sviluppo preclinico, sono oggetto di accordi per la creazione di start-up, investimenti da venture funds, o per il licenziamento ad aziende del settore.

Ri.MED possiede oggi un portfolio progetti diversificato e bilanciato, guidato da un team multidisciplinare con chiari obiettivi di sviluppo di prodotto nell'ottica bench to bedside. L'integrazione con il partner IRCCS ISMETT, permette di fare ricerca truly translational, grazie a competenze complementari di discovery, ricerca preclinica e clinica.

Un riconoscimento a tutti coloro che lavorano ogni giorno per realizzare, con passione e resilienza, gli obiettivi tangibili della nostra mission, migliorando le condizioni di vita dei pazienti, formando ed offrendo prospettive a giovani ricercatori e dando un contributo alla rinascita socio economica della Sicilia e del Sud Italia.

MISSION E MODELLO ECONOMICO





Dario Vignali
DIRETTORE SCIENTIFICO

La missione della Fondazione Ri.MED è tradurre la ricerca biotecnologica e biomedica in nuove cure per i pazienti, fornendo un impatto socio-economico positivo, specialmente in Sicilia e nel Sud Italia con progetti di ricerca traslazionale che mirano ad affrontare i bisogni terapeutici nelle aree delle malattie oncologiche, cardiovascolari, neurodegenerative, metaboliche e terminali d'organo. La mission di Ri.MED è anche quella di facilitare il reclutamento, la formazione ed il training della prossima generazione di scienziati biomedici italiani.

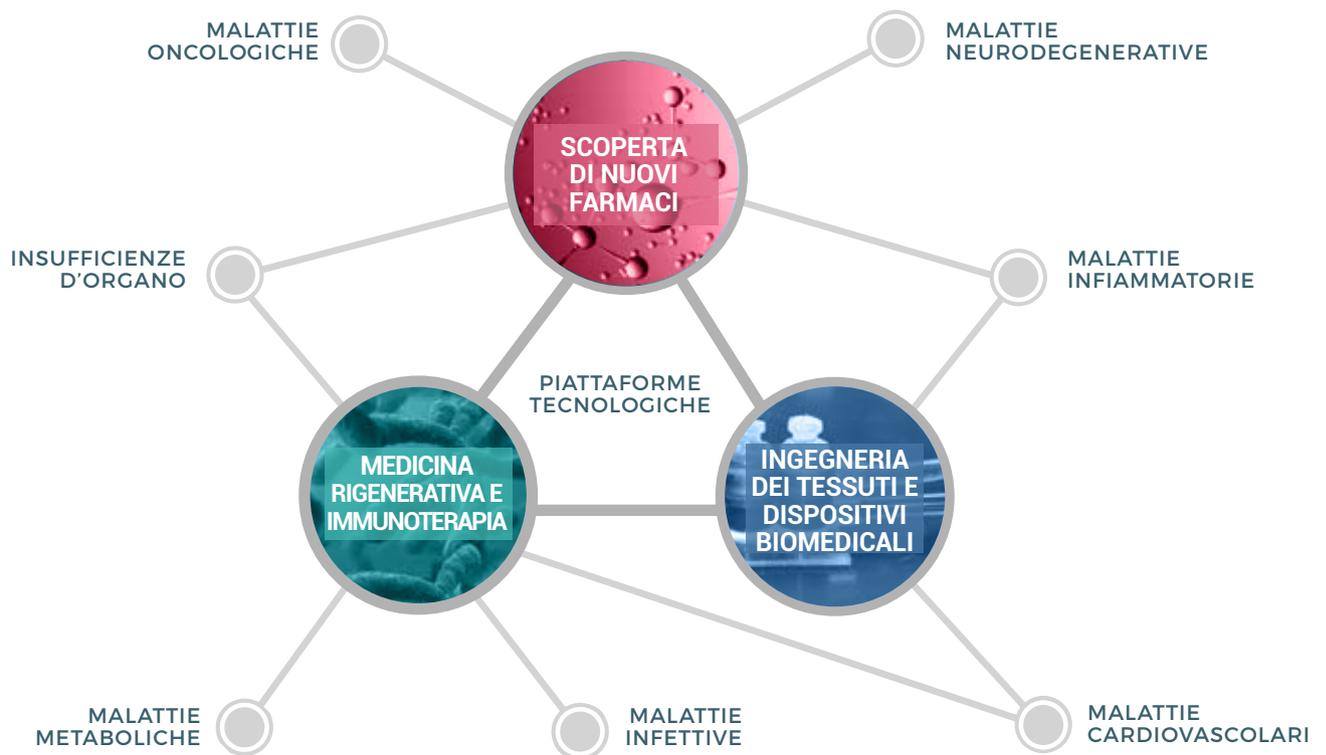
La ricerca traslazionale si focalizza sull'integrazione complementare di risorse e competenze di diverse matrici: la ricerca di base, la ricerca e lo sviluppo preclinico di nuove terapie, medical device, biomarcatori ed infine la sperimentazione clinica. Grazie all'impegno dei soci fondatori, in particolare del Consiglio Nazionale delle Ricerche (CNR), dell'Università di Pittsburgh e del Centro Medico dell'Università di Pittsburgh (University of Pittsburgh Medical Centre -UPMC), la Fondazione ha sviluppato programmi di ricerca traslazionali e facilitato la formazione di giovani ricercatori biomedici.

Con la partnership strategica con l'IRCCS ISMETT di Palermo, è stato possibile promuovere progetti multidisciplinari nel campo della medicina rigenerativa e delle terapie cellulari, compresa la creazione di laboratori di ricerca e produzione Cell-factory GMP a supporto delle sperimentazioni cliniche. L'obiettivo della Fondazione è facilitare lo scambio di know-how tra medici e ricercatori e la traduzione di nuove scoperte e nuove terapie "dal laboratorio al letto del paziente" (B2B, from bench to bedside). La Fondazione è inoltre impegnata nello sviluppo di nuove cure immunoterapie per il trattamento del cancro e di altre patologie e a limitare il rigetto nei pazienti con trapianto d'organo.

Nell'ultimo trimestre del 2017, il Comitato Scientifico ha avviato un processo di rivalutazione della ricerca e del focus terapeutico di Ri.MED con l'obiettivo di sviluppare una strategia per garantire competitività a livello nazionale e internazionale, per tradurre la ricerca in studi clinici in modo efficiente ed efficace e per fornire un impatto socio-economico significativo a livello regionale e nazionale. Il Comitato Scientifico sta anche rivedendo la sua strategia di reclutamento e formazione per i giovani scienziati biomedici italiani.

Nel 2018, sarà finalizzata la nostra strategia di ricerca e verrà elaborato un piano di ricerca a medio termine per costruire un percorso verso l'apertura del Centro per la Biotecnologia e la Ricerca Biomedica (CBRB) Ri.MED in Sicilia.

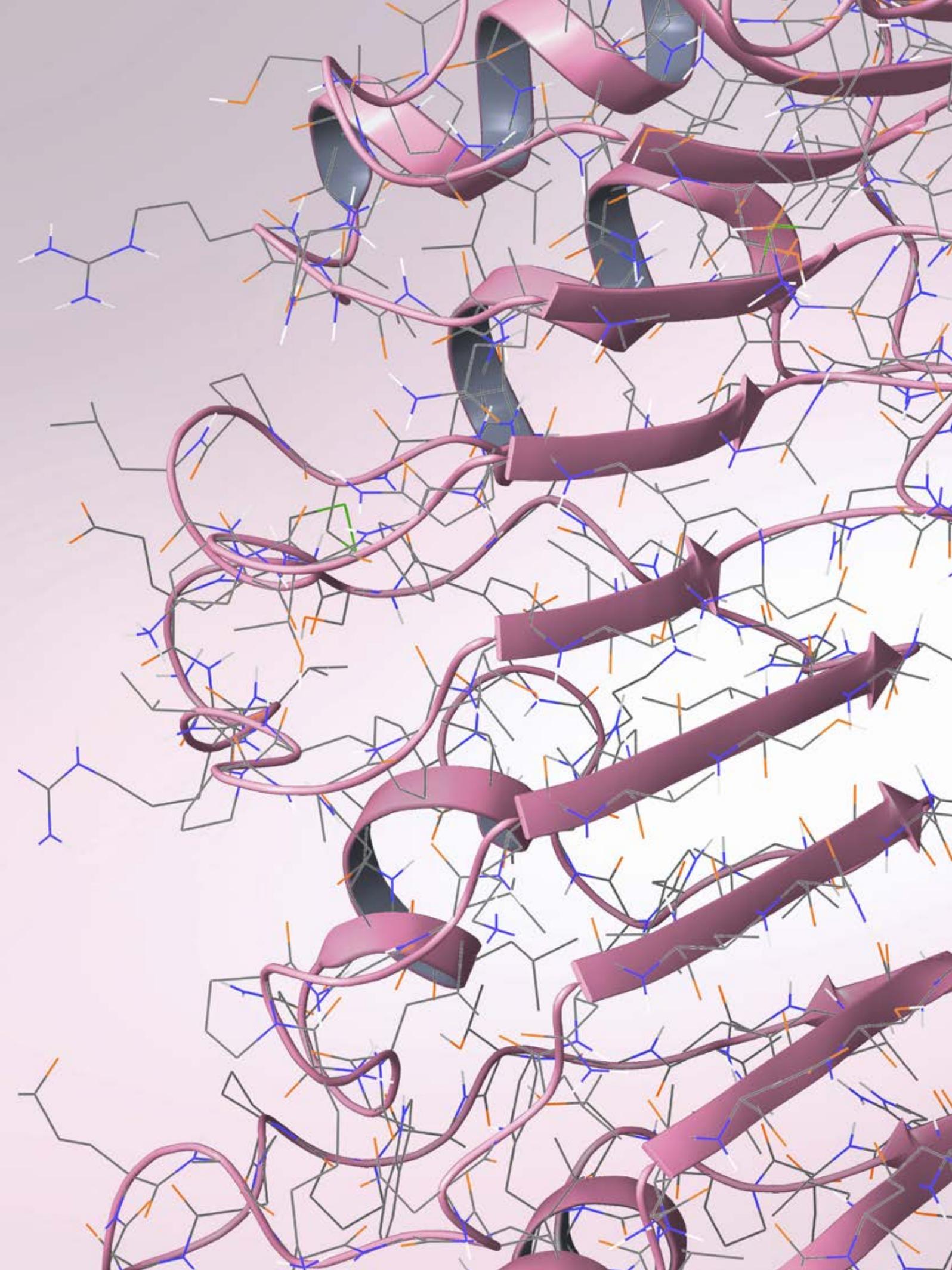
APPROCCI DI RICERCA E AREE TERAPEUTICHE



INDICE

SCOPERTA DI NUOVI FARMACI	pag 9	MEDICINA RIGENERATIVA E IMMUNOTERAPIA	pag 33
MALATTIE NEURODEGENERATIVE		INSUFFICIENZE D'ORGANO	
Meccanismi molecolari di patologie da <i>misfolding</i> proteico: funzione fisiologica <i>versus</i> aggregazione. Caterina Alfano, PhD	pag 10	Cellule dendritiche regolatorie nella prevenzione del rigetto di organo Ester Badami, PhD	pag 34
Sviluppo e caratterizzazione di un modello di <i>zebrafish</i> per lo studio dell'ataxia cerebellare ereditaria Chiara Cianciolo Cosentino, PhD	pag 12	Terapia mediata da cellule NK nel tumore ed infezione cronica. Ester Badami, PhD	pag 35
Stimolazione del sistema degli endocannabinoidi nella prevenzione dell'epilessia del lobo temporale Roberto Di Maio PhD	pag 14	Secretoma con potenziale uso clinico isolato da cellule umane fetali dermiche Cinzia Chinnici, PhD	pag 38
Meccanismi di patogenesi nella malattia di Parkinson Roberto Di Maio, PhD	pag 15	Ingegnerizzazione di un rene all'interno di organi linfoidi secondari Maria Giovanna Francipane, PhD	pag 40
MALATTIE INFIAMMATORIE		Caratterizzazione cellule mesenchimali ed epiteliali da placenta Mariangela Pampalone	pag 43
Infiammazione steroido-resistente nella broncopneumopatia cronica ostruttiva (BPCO): meccanismi e sviluppo di nuovi farmaci Chiara Cipollina, PhD	pag 16	MALATTIE INFETTIVE	
Formazione gastrica, assorbimento intestinale e distribuzione sistemica lipoproteina-dipendente degli acidi grassi nitrati (NO ₂ -FA) Marco Fazzari, PhD	pag 18	Sviluppo di un vaccino contro <i>Klebsiella pneumoniae</i> Bruno Douradinha, PhD	pag 44
Generazione gastrica e meccanismo d'azione cellulare dei lipidi nitrito-nitrati: nuovi intermedi lipidici che generano specie nitrosanti ed elettrofliche Marco Fazzari, PhD	pag 20	Sviluppo di una nuova immuno-terapia contro <i>Klebsiella pneumoniae</i> Bruno Douradinha, PhD	pag 46
MALATTIE ONCOLOGICHE		Ceppi probiotici di <i>Saccharomyces cerevisiae</i> geneticamente modificati come potenti induttori di risposte immunitarie cellulari e mucosali contro l'HIV Bruno Douradinha, PhD	pag 48
Cancro ed Infiammazione Sandra Cascio, PhD	pag 22	MALATTIE METABOLICHE	
Identificazione del complesso MUC1/CIN85 come nuovo target terapeutico per inibire le metastasi Sandra Cascio, PhD	pag 24	Hsp10/EPF nel pancreas umano: possibile ruolo nella funzionalità delle isole di Langerhans Simona Corrao, PhD	pag 50
Sviluppo di algoritmi per modellizzare il network di interazione di microRNA e relativi target Claudia Coronello, PhD	pag 26	Trapianto di Isole Pancreatiche Mariangela Pampalone	pag 52
INSUFFICIENZE D'ORGANO		MALATTIE CARDIOVASCOLARI	
Sindrome nefrotica e <i>zebrafish</i> come modello sperimentale Chiara Cianciolo Cosentino, PhD	pag 28	Studio della funzione delle globine nella rigenerazione del cuore di <i>zebrafish</i> e nello sviluppo embrionale Paola Corti, PhD	pag 54
Identificazione e caratterizzazione di nuovi geni regolatori del simportatore NA ⁺ /CL ⁻ apicale nel tubulo contorto distale del rene Chiara Cianciolo Cosentino, PhD	pag 29		

INGEGNERIA DEI TESSUTI E DISPOSITIVI BIOMEDICALI	pag 57	PIATTAFORME TECNOLOGICHE	pag 93
MALATTIE CARDIOVASCOLARI		BIOINFORMATICA	pag 94
Sviluppo di una valvola cardiaca in tessuto animale priva di Alfa-Gal <i>Gaetano Burriesci, PhD</i>	pag 58	BIOINGEGNERIA	pag 96
Predizione del potenziale di lesioni ischemiche a seguito di terapie cardio-valvolari <i>Gaetano Burriesci, PhD</i>	pag 60	BIOLOGIA STRUTTURALE E BIOFISICA	pag 99
Analisi dell'appendice atriale sinistra per predire il rischio di trombosi <i>Gaetano Burriesci, PhD</i>	pag 62	COMPUTER AIDED DRUG DESIGN	pag 101
Sviluppo di una valvola aortica transcateretere innovativa <i>Gaetano Burriesci, PhD</i>	pag 64	PROTEOMICA	pag 104
Sviluppo di una valvola mitrale transcateretere innovativa <i>Gaetano Burriesci, PhD</i>	pag 66		
Valvole cardiache ingegnerizzate (TEHV) <i>Antonio D'Amore, PhD</i>	pag 68	FINANZIAMENTI PER LA RICERCA	pag 107
Parete di miocardio ingegnerizzata (TECP) <i>Antonio D'Amore, PhD</i>	pag 70	PROGETTI FINANZIATI NEL CORSO DEL 2017	pag 108
Vasi sanguigni ingegnerizzati (TEVG) <i>Antonio D'Amore, PhD</i>	pag 72	PROGETTI DI RICERCA PRESENTATI NEL 2017	pag 109
Analisi strutturale ed istopatologica per immagini di tessuti nativi ed ingegnerizzati (NET-IBA) <i>Antonio D'Amore, PhD</i>	pag 74	DOTTORATI DI RICERCA INNOVATIVI A CARATTERIZZAZIONE INDUSTRIALE	pag 110
Modelli numerici per la meccanica e la crescita tissutale di tessuti nativi ed ingegnerizzati (NET-MTG) <i>Antonio D'Amore, PhD</i>	pag 76	BREVETTI	pag 112
Bioreattori per l'elaborazione e deposizione di matrice extracellulare (BE-ECM) <i>Antonio D'Amore, PhD</i>	pag 78		
Modellazione <i>in-silico</i> per la stratificazione del rischio clinico di patologie cardiovascolari <i>Salvatore Pasta, PhD</i>	pag 80		
MALATTIE INFIAMMATORIE			
Un sistema di coltura organotipica 3D microfisiologico per studiare il degrado e la rigenerazione di tessuti scheletrici compositi in microgravità <i>Riccardo Gottardi, PhD</i>	pag 82		
OACTIVE - Modelli computazionali avanzati personalizzati su più livelli per la prevenzione dell'osteoartrite <i>Riccardo Gottardi, PhD</i>	pag 84		
Sviluppo di bioreattori osteocondrali e di <i>scaffold</i> per lo studio degli effetti degli ormoni sessuali sulle patologie articolari e per la rigenerazione tissutale <i>Riccardo Gottardi, PhD</i>	pag 85		
R-CaRE - Riabilitazione per la Rigenerazione Cartilaginea <i>Riccardo Gottardi, PhD</i>	pag 88		
APPLICAZIONE BIOMEDICALE E BIOTECNOLOGICA			
Sviluppo di bio-adesivi per ambienti acquosi <i>Caterina Alfano, PhD</i>	pag 90		





SCOPERTA 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.

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 scoperta 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 poi testate biologicamente e validate con screening biofisico. 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.

Area Terapeutica: **MALATTIE NEURODEGENERATIVE**

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

Caterina Alfano, Ph.D.

calfano@fondazionerimed.com

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 i meccanismi molecolari delle malattie da *misfolding* proteico e ci basiamo sul concetto che la conoscenza della normale funzione e della rete di interazione delle proteine aggregogeniche sia uno strumento chiave per progettare molecole che possano competere specificamente con l'aggregazione. Questo approccio è ben distinto dai precedenti, spesso concentrati sull'identificazione di agenti anti-aggreganti non specifici quali blu di metilene, polioli o altre piccole molecole. Le interazioni native proteina-proteina potrebbero invece fornire importanti mezzi per alterare e controllare la funzione e l'assemblaggio delle proteine coinvolte nelle malattie neurodegenerative e potrebbero svolgere un ruolo protettivo contro la loro aberrante aggregazione. L'ipotesi è supportata da dati preliminari sulle proteine atassina-1 e -3, i quali incoraggiano ulteriori studi su questa linea e aprono nuove possibilità per lo sviluppo di nuove terapie. La conferma di questa ipotesi permetterebbe di capire i meccanismi molecolari alla base delle malattie da *misfolding* proteico e fornirebbe nuovi strumenti per prevenirle.

Impatto

Il progetto di ricerca affronta questioni chiave ed ancora senza risposta nell'ambito della biologia strutturale e cellulare, questioni essenziali per la comprensione di malattie neurodegenerative e per la progettazione di terapie specifiche. Inoltre, la comprensione dei meccanismi molecolari che portano alla formazione di fibre di tipo amiloide non è solo legata alle malattie neurodegenerative, ma può contenere più in generale indizi sul fenomeno fondamentale del *fold*ing e assemblaggio di proteine.

Risultati raggiunti nel 2017

I nostri studi condotti su atassina-3, la proteina responsabile dell'atassia spinocerebellare di tipo 3 ereditaria - la più comune atassia spinocerebellare autosomica dominante - hanno dimostrato che sia l'atassina-3 non espansa (cioè con 18 ripetizioni di Gln), sia l'atassina-3 espansa (cioè con 50 ripetizioni di Gln), autoassemblano in fibrille con caratteristiche marcatamente simili su un ampio intervallo di temperature. Le fibrille hanno una struttura irregolare, che può essere interpretata come una stringa di perline sferoidali o come un filamento planare arricciato. I nostri risultati mostrano che la formazione di queste fibrille è fortemente inibita dalla presenza di catene di polyUb, interattore naturale dell'atassina-3, a conferma della nostra ipotesi secondo cui gli interattori naturali potrebbero alterare e controllare la funzione e l'assemblaggio delle proteine coinvolte nelle malattie neurodegenerative e svolgere un ruolo protettivo contro l'aggregazione aberrante.



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*, accepted.

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.

Wang A.F., Deighan P., Chen S., Barrasso K., Garcia C., Martínez-Lumbreras S., Alfano C., Krysztofinska E.M., Thapaliya A., Camp A.H., Isaacson R.L., Hochschild A. and Losick R. (2017) A Novel RNA Polymerase-binding Protein that interacts with a Sigma-Factor Docking Site. *Molecular Microbiology*, 105(4):652-662.

Alfano C., Sanfelice D., Martin S., Pastore A. and Temussi P. (2017) An optimized strategy to measure protein stability highlights differences between cold and hot unfolded states. *Nature Comm*, 8:15428.

Watts N., Zhuang X., Kaufman J., Palmer I., Dearborn A., Coscia S., Blech-Hermoni Y., Alfano C., Pastore A. Mankodi A. and Wingfield P. (2017) The Expression and Purification of ZASP Subdomains and Clinically Important Isoforms: High-affinity Binding to G-actin. *Biochemistry*, 56(14):2061-2070.

Bottega R., Nicchia E., Alfano C., Glembotsky A.C., Pastore A., Bertaggia-Calderara D., Bisig B., Duchosal M.A., Arbesú G., Alberio L., Heller P.G. and Savoia A. (2017) Gray platelet syndrome: Novel mutations of the NBEAL2 gene. *American Journal of Hematology* 92(2):E20-E22.

Obiettivi per il 2018

Iniziare un approccio di *drug design* sull'atassina-3 al fine di identificare molecole che, imitando gli interattori naturali dell'atassina-3, sono in grado di agire come inibitori della malattia.

Area Terapeutica: **MALATTIE NEURODEGENERATIVE**

Sviluppo e caratterizzazione di un modello di *zebrafish* per lo studio dell'ataxia cerebellare ereditaria

Chiara Cianciolo Cosentino, Ph.D.

ccianciolo@fondazionerimed.com

Breve descrizione

I membri della famiglia di fattori di trascrizione CAMTA (*calmodulin binding transcription activators*) funzionano come regolatori dell'espressione genica e sono presenti in tutti gli organismi multicellulari dalle piante fino all'uomo.

Nell'uomo, ri-arrangiamenti intragenici nel gene CAMTA1 sono stati associati con l'ataxia cerebellare congenita non progressiva in diverse famiglie indipendenti. Inoltre, studi nei topi hanno dimostrato come il gene CAMTA1 abbia un ruolo essenziale nella regolare la funzione delle cellule del *Purkinje* nel cervelletto, ma i meccanismi molecolari non sono ancora stati identificati. Per analizzare la funzione di CAMTA1 *in vivo*, abbiamo eseguito esperimenti di *knock-down* e di *knock-out* dell'ortologo del gene CAMTA1 in *zebrafish* tramite l'utilizzo di morpholino e CRISPR/Cas9.

Il *knock-down* (morpholino) e il *knock out* (CRISPR/Cas9) di *camta1a* in *zebrafish* portano ad un fenotipo simile a quello osservato nei topi e nell'uomo, caratterizzato da degenerazione di cellule neuronali, riduzione del numero di cellule del *Purkinje* nel cervelletto e problemi di tipo motorio.

Impatto

I risultati finora ottenuti dimostrano che *zebrafish* rappresenta un modello animale ideale per lo studio dei meccanismi molecolari dell'ataxia e della funzione del cervelletto. Ulteriori studi del CAMTA1 *signaling pathway* nel sistema nervoso centrale potranno contribuire all'identificazione di nuove potenziali strategie terapeutiche.

Risultati raggiunti nel 2017

- Identificazione degli ortologi in *zebrafish* del gene CAMTA1 e analisi dell'espressione del gene nelle larve e nell'adulto.
- Esperimenti di knock-down con nucleotidi antisense morpholino, analisi morfologiche e comportamentali
- Creazione di linee di pesci mutanti per il gene *camta1a* tramite la tecnica CRISPR/Cas9
- Screening, analisi morfologiche, funzionali e comportamentali delle linee di pesci mutanti
- Isolamento delle cellule del *purkinje* dal cervelletto di topi CAMTA1 knock-out e controllo, FACS sorting e analisi trascrittomiche

Conferenze

From fish to men: Zebrafish as a model system to study human CAMTA1-related ataxia. Seminar at *The zebrafish model in Biotechnology and Health Sciences*, Dicembre 2017, Palermo, ITA



Pubblicazioni

Cianciolo Cosentino C. (2017). Paradigms for the Quantification of Behavioral Responses in *zebrafish*. In A. Celik, M. F. Wernet (Eds.) *Decoding Neural Circuit Structure and Function* (pp 223-239). *Springer*.

Mansouri M, Bellon-Echeverria I, Rizk A, Ehsaei Z, Cianciolo Cosentino C, Silva CS, Xie Y, Boyce FM, Davis MW, Neuhaus SC, Taylor V, Ballmer-Hofer K, Berger I, Berger P. (2016) Highly efficient baculo-virus-mediated multigene delivery in primary cells. *Nat Commun.* (2016) 4;7:11529. PMID: 27143231.

Obiettivi per il 2018

Comparando il profilo di espressione genica delle cellule del *Purkinje* nei topi controllo e CAMTA1 KO abbiamo identificato una serie di geni che presentano significative differenze del loro livello di espressione nei due gruppi. Il nostro prossimo obiettivo è di analizzare in dettaglio alcuni di questi geni al fine di fare luce sul ruolo del gene CAMTA1 nel cervelletto.

Area Terapeutica: **MALATTIE NEURODEGENERATIVE**

Stimolazione del sistema degli endocannabinoidi nella prevenzione dell'epilessia del lobo temporale

Roberto Di Maio Ph.D.

rdimaio@fondazionerimed.com

Breve descrizione

Durante gli ultimi anni, l'uso dei cannabinoidi nel trattamento dell'epilessia ha prodotto promettenti evidenze di efficacia, ma, ad oggi, la possibilità di una applicazione nella pratica clinica rimane altamente dibattuta a causa di un alto potenziale di effetti collaterali correlati ad una risposta "Bifasica" e concentrazione-dipendente mediata dai cannabinoidi

Impatto

Tuttora è necessario fornire evidenze sui meccanismi di azione dei cannabinoidi. La comprensione delle esatte risposte biochimiche indotte dai cannabinoidi nel sistema nervoso centrale aiuteranno all'ottimizzazione terapeutica attraverso la sintesi di nuove molecole con azione benefica (antiepilettica in questo caso) simile ai cannabinoidi ma con bassa potenzialità nell'indurre effetti indesiderati. La creazione di questi nuovi farmaci contribuirà alla cura ed alla prevenzione della malattia epilettica riducendone l'impatto sociale ed economico.

Risultati raggiunti nel 2017

Studi condotti nel nostro laboratorio evidenziano la crucialità dei fenomeni ossidativi cellulari durante la progressione della malattia epilettica. Inoltre, abbiamo ottenuto evidenze sperimentali sull'uso dei cannabinoidi nella prevenzione dell'insorgenza dell'epilessia del lobo temporale in modelli sperimentali. Tale prevenzione si espleta anche attraverso la modulazione delle risposte ossidative indotte dal parossismo eccitatorio tipico della malattia. Tuttavia, i risultati suggeriscono che l'azione dei cannabinoidi sui recettori cerebrali potrebbe avere effetti opposti correlati alla dose di trattamento, ponendo pertanto il problema degli effetti indesiderati.

Obiettivi per il 2018

Le nostre ricerche si orienteranno verso la sintesi di nuove molecole in grado di non interagire con i recettori canonici per i cannabinoidi ma direttamente e specificamente con i recettori espressi nei mitocondri, organelli cellulari che modulano la risposta bioenergetica ed ossidativa cellulare, la cui disfunzione rappresenta un fattore critico nella progressione della malattia epilettica.



Area Terapeutica: **MALATTIE NEURODEGENERATIVE**

Meccanismi di patogenesi nella malattia di Parkinson

Roberto Di Maio Ph.D.

rdimaio@fondazionerimed.com

Breve descrizione

Lo scopo delle ricerche è finalizzato ad evidenziare gli eventi cellulari cruciali per l'innescamento neurodegenerativo delle aree cerebrali coinvolte nella malattia di Parkinson.

Impatto

La definizione degli eventi patogenici precoci nella malattia di Parkinson supporta il potenziale sviluppo di nuovi approcci terapeutici finalizzati a prevenire la progressione della malattia. Questi studi, pertanto, hanno l'obiettivo di curare una malattia ad alto impatto sociale ed economico.

Risultati raggiunti nel 2017

I risultati ottenuti rivelano interessanti evidenze sull'importanza di alcune molecole o enzimi, come la sinucleina e LRRK2 nell'innescamento della malattia di Parkinson attraverso l'induzione ad un'alterata funzione mitocondriale ed al conseguente danno ossidativo, un fenomeno comune a molte malattie neurodegenerative.

Conferenze

A central role of LRRK2 in idiopathic Parkinson's disease. Gordon research Conference, giugno 2017
Portland, USA

Pubblicazioni

Di Maio R., Barrett P.J., Hoffman E.K., Barrett C., Zharikov A., Borah A., Hu X., McCoy J., Chu C.T., Burton E.A., Hastings T.G. and Greenamyre J.T., (2016) α -Synuclein binds TOM20 and inhibits mitochondrial protein import in Parkinson's disease. *Sci Transl Med.* 2016 Jun 8;8(342):342ra78. doi: 0.1126/scitranslmed.aaf3634. PMID:27280685

Obiettivi per il 2018

Gli obiettivi futuri di questo progetto riguardano lo studio dell'enzima NADPH ossidasi isoforma 2 (Nox2), uno dei maggiori enzimi responsabili per la produzione di radicali liberi nei neuroni. Abbiamo già evidenze preliminari che l'enzima può modulare, tramite un'interazione funzionale con i mitocondri, la formazione di forme tossiche di sinucleina e l'attivazione dell'enzima LRRK2, due eventi critici nell'iniziazione della malattia di Parkinson. In un prossimo futuro, testeremo l'efficacia neuroprotettiva di nuovi inibitori di Nox2 ad azione specifica in modelli sperimentali di Parkinson. Risultati positivi hanno il grande potenziale di identificare uno o più agenti terapeutici in grado di intervenire su differenti aspetti patogenici del Parkinson e pertanto di prevenire la malattia nella sua complessità.

Area Terapeutica: **MALATTIE INFIAMMATORIE**

Inflammatione steroido-resistente nella broncopneumopatia cronica ostruttiva (BPCO): meccanismi e sviluppo di nuovi farmaci

Chiara Cipollina, Ph.D.

ccipollina@fondazionerimed.com

Breve descrizione

La broncopneumopatia cronica ostruttiva (BPCO) è la quarta causa di morte nel mondo. È una malattia polmonare progressiva caratterizzata da ostruzione non completamente reversibile del flusso aereo ed è associata ad una risposta infiammatoria incontrollata delle vie aeree a particolato e gas nocivi, tra cui fumo di sigaretta e sostanze inquinanti. L'infiammazione nella BPCO non risponde al trattamento con steroidi e la terapia attuale è principalmente sintomatica. E' quindi necessario lo sviluppo di nuovi farmaci. L'attivazione incontrollata della risposta immunitaria innata nell'epitelio polmonare è un segno distintivo della BPCO. Pertanto, il nostro progetto mira a indagare il coinvolgimento dell'epitelio bronchiale e dei macrofagi alveolari, oltre che della loro interazione, nella patogenesi dell'infiammazione steroido-resistente. Attualmente il nostro focus è sullo stress ossidativo, sul danno mitocondriale e sull'invecchiamento cellulare. Inoltre, stiamo testando l'ipotesi che l'inflammasoma NLRP3, così come altri complessi analoghi, possano essere attivati nelle vie aeree dei pazienti con BPCO e contribuire al danno tissutale, all'infiammazione cronica e alla steroido-resistenza. Infine, stiamo valutando se derivati endogeni elettrofili generati dagli acidi grassi omega-3 (tra cui il 17-oxo-DHA) possano essere efficaci per il trattamento dell'infiammazione steroido-resistente e del tumore polmonare.

Impatto

Questo progetto di ricerca contribuirà alla scoperta di nuovi meccanismi alla base dell'infiammazione steroido-resistente in malattie croniche delle vie aeree come la BPCO. L'identificazione di nuovi meccanismi patologici rivelerà target fino ad oggi sconosciuti e che potrebbero essere utilizzati per lo sviluppo di nuove terapie più efficaci. Inoltre, genereremo nuove conoscenze riguardanti il possibile uso della molecola 17-oxo-DHA per il trattamento dell'infiammazione steroido-resistente e del cancro ai polmoni.

Risultati raggiunti nel 2017

Abbiamo scoperto che la molecola 17-oxo-DHA mostra effetti anti-infiammatori additivi quando utilizzato insieme allo steroide fluticasone propionato (FP) in cellule mononucleate isolate dal sangue periferico (PBMC) di pazienti con BPCO e di individui sani. Rispetto al FP, il 17-oxo-DHA agisce attraverso meccanismi diversi e complementari, sia trascrizionali che post-trascrizionali. In particolare, abbiamo scoperto che il 17-oxo-DHA inibisce fortemente l'attivazione dell'inflammasoma NLRP3 e quindi della caspasi-1, riducendo così il rilascio di IL-1 β e la degradazione del recettore dei glucocorticoidi. L'inibizione dell'inflammasoma NLRP3 da parte del 17-oxo-DHA avviene a valle



della via di ERK e dei ROS mitocondriali e non dipende dal pathway di AKT. Abbiamo inoltre scoperto che lo steroide FP non è in grado di inibire l'attivazione dell'inflammasoma. Abbiamo anche studiato le proprietà antitumorali del 17-oxo-DHA e abbiamo scoperto che questo composto elettrofilico contrasta la crescita di cellule di tumore polmonare e migliora l'efficacia del farmaco antitumorale convenzionale gemcitabina.

Conferenze

17-oxo-DHA inhibits the NLRP3 inflammasome downstream of mitochondrial ROS and ERK pathway. Presentazione orale a *ERS Congress 2017*, Settembre 2017, Milano, ITA: Cipollina C, Di Vincenzo S, Lo Piparo D, Pace E. *European Respiratory Journal* Sep 2017, 50 (suppl 61) OA284; DOI: 10.1183/1393003.congress-2017.OA284.

Pubblicazioni

17-oxo-DHA counteracts lung cancer cell growth and enhances the efficacy of gemcitabine, Siena L, Cipollina C, Di Vincenzo S, Ferraro M, Bruno A, Gjemarkaj M, Pace E. *Cancer Chemotherapy and Pharmacology*. equal contribution. *Request of revision*.

SIRT1 / FoxO3 axis alteration leads to aberrant immune responses in bronchial epithelial cells, Di Vincenzo S, Heijink IH, Noordhoek JA, Cipollina C, Siena L, Bruno A, Ferraro M, Postma DS, Gjemarkaj M, and Pace E, *J Cell Mol Med*, 2018. *In press*.

Ceftaroline modulates the innate immune and host defense responses of immunocompetent cells exposed to cigarette smoke, Bruno A, Cipollina C, Di Vincenzo S, Siena L, Dino P, Di Gaudio F, Gjemarkaj M, Pace E. *Toxicol Lett*, 2017, 279: 9-15.

Obiettivi per il 2018

- Valutare l'impatto del fumo di sigaretta sull'attivazione dell'inflammasoma;
- indagare sul coinvolgimento dell'attivazione dell'inflammasoma nella patogenesi della BPCO;
- chiarire i meccanismi dell'inibizione dell'inflammasoma da parte di 17-oxo-DHA;
- individuare nuovi inibitori selettivi dell'inflammasoma NLRP3.

Area Terapeutica: **MALATTIE INFIAMMATORIE**

Formazione gastrica, assorbimento intestinale e distribuzione sistemica lipoproteina-dipendente degli acidi grassi nitrati (NO₂-FA)

Marco Fazzari, Ph.D.

mfazzari@fondazionerimed.com

Breve descrizione

Sulla base delle scoperte fatte durante l'esecuzione del mio progetto l'anno scorso, ho scoperto che i trigliceridi sono un componente principale della bio-distribuzione dei NO₂-FA, che comporta assorbimento, trasporto e consegna mirata. Attraverso studi di etichettatura [¹⁴C] e indagini basate sulla spettrometria di massa in campioni clinici e preclinici, sono stato in grado di stabilire l'esterificazione come un meccanismo principale ancora inesplorato di consegna di NO₂-FA.

Impatto

Questo piano di ricerca proposto fornirà importanti informazioni su:

- il potenziale assorbimento dell'acido oleico nitrato (NO₂-OA) attraverso il sistema linfatico intestinale, che essenzialmente protegge NO₂-OA dal metabolismo epatico di primo passaggio;
- la farmacologia degli acidi grassi nitrati endogeni scoperti di recente che potrebbero essere utilizzati come profarmaci per ridurre gli effetti collaterali osservati con NO₂-OA.

Risultati raggiunti nel 2017

Ho descritto la farmacocinetica di NO₂-OA in cavie dopo somministrazione orale od i.v.

Conferenze

Abstract da conferenza internazionale:

M. Fazzari, D. Chartoumpekis, L. Li, D.A. Guimaraes, S. Shiva, B.A. Freeman, N. Khoo. *Nitro-oleic acid protects mice from diet-induced hepatic steatosis and insulin resistance without the adverse side effects of thiazolidinediones*. *Free Radical Biology and Medicine* 2017, 112: S1 – doi:10.1016/j.free-radbiomed.2017.10.232.

Pubblicazioni

M. Fazzari, N. Khoo, R.S. Woodcock, D.K. Jorkasky, L. Li, F.J. Schopfer, B.A. Freeman. Nitro-fatty acid pharmacokinetics in the adipose tissue compartment. *Journal of Lipid Research*, 2017, 58:(2), 375-385 – doi:10.1194/jlr.M072058.

S.R. Salvatore, D.A. Vitturi, M. Fazzari, D.K. Jorkasky and F.J. Schopfer. Evaluation of 10-nitro oleic acid bio-elimination in rats and humans. *Nature Scientific Reports*, 2017, 7: 39900 – doi:10.1038/srep39900.



Obbiettivi per il 2018

Definire il meccanismo di assorbimento intestinale del NO₂-OA nei roditori. Stabiliremo il ruolo dei chilomicroni nell'assorbimento e trasporto di NO₂-OA. Verrà utilizzato un modello di ratto con vena porta e dotto linfatico mesenterico cannulati. A questo proposito, abbiamo sviluppato un'analisi HPLC-MS / MS per rilevare i trigliceridi contenenti NO₂-OA e un metodo di idrolisi acida per quantificare NO₂-OA libero ed esterificato nella linfa mesenterica e nel plasma portale.

Determinare l'effetto dell'acido linoleico coniugato nitrato (NO₂-CLA) e lipidi nitrito-nitrati nella regolazione dell'assorbimento dell'acqua a livello intestinale. Le acquaporine svolgono un ruolo importante nell'omeostasi dell'acqua a livello intestinale e possono essere coinvolte nei fenomeni di diarrea riscontrati nei modelli animali preclinici trattati con NO₂-OA. Il confronto tra i diversi NO₂-FA chiarirà la capacità dei lipidi nitrito-nitrati di ridurre questo sgradevole effetto collaterale. Questo potenzierà il valore dei lipidi nitrito-nitrati come potenziali profarmaci senza effetti gastrointestinali.

Area Terapeutica: **MALATTIE INFIAMMATORIE**

Generazione gastrica e meccanismo d'azione cellulare dei lipidi nitrito-nitrati: nuovi intermedi lipidici che generano specie nitrosanti ed elettrofili

Marco Fazzari, Ph.D.

mfazzari@fondazionerimed.com

Breve descrizione

L'ambiente acido gastrico è un sito importante per la generazione nitrito-mediata di acidi grassi nitrati elettrofili. Queste specie hanno mostrato effetti salutari in numerosi processi di malattie infiammatorie modulando meccanismi d'azione cellulare attraverso modificazione post-traslazionale di proteine.

La presente ricerca propone che la nitratura gastrica di acido linoleico coniugato (CLA), sia libero che esterificato, proceda attraverso la formazione di intermedi instabili lipidici nitrito-nitrati che sono stati caratterizzati via HPLC-spettrometria di massa (HPLC-MS/MS). La decomposizione di queste specie, che è spontanea a pH fisiologico per i derivati del CLA libero e catalizzati dall'idrolisi lipasi-mediata dei trigliceridi nitrito-nitrati, producono sia acido linoleico coniugato nitrato (NO₂-CLA), sia specie reattive del nitrogeno con concomitante attivazione *in vitro* di guanilato ciclastasi e 2,3-diaminonaftalene.

È importante sottolineare, che questi derivati nitrito-nitrati sono stati analizzati nel fluido gastrico di ratto dopo somministrazione orale di CLA e nitrito, evidenziando la rilevanza fisiologica della nostra scoperta. I nostri risultati gettano nuova luce sulle reazioni complesse e sui processi coinvolti nella generazione gastrica di acidi grassi nitrati e identificano una nuova classe di mediatori lipidici nitrito-nitrati con il potenziale di modulare le vie cGMP-dipendenti, partecipando alla nitrosazione di proteine e promuovendo la formazione di NO₂-CLA.

Impatto

Il piano di ricerca proposto fornirà informazioni sulla generazione e funzioni biologiche protettive dei derivati lipidici nitrito-nitrati, una classe di mediatori dei meccanismi d'azione cellulare già coperti da un brevetto generato durante l'ultimo anno. Questi studi, basati su specie recentemente scoperte per essere formate durante la digestione, ridurranno gli effetti indesiderati riportati dall'uso dell'acido oleico nitrato, un farmaco attualmente in fase di valutazione in tre diversi studi clinici. Il completamento del progetto di ricerca fornirà una nuova generazione di molecole con un profilo farmacologico migliorato e un valore aggiunto.

Risultati raggiunti nel 2017

Ho identificato e caratterizzato nuovi lipidi nitrito-nitrato dopo digestione gastrica *in vitro* di standard lipidici contenenti acido linoleico coniugato (CLA). Inoltre, ho studiato la decomposizione di derivati nitrito-nitrato in condizioni fisiologiche.



Proprietà intellettuale

Brevetto U.S.A. in attesa di concessione No. 62/404,354 intitolato: Novel reversible nitroxide derivatives of nitroalkenes that mediate nitrosating and alkylating reactions. Inventori: Marco Fazzari, Francisco J. Schopfer and Bruce Freeman.

Obbiettivi per il 2018

I miei obiettivi di ricerca attuali ed a breve termine affronteranno la biochimica e la farmacologia dei mediatori dei meccanismi d'azione cellulare dei lipidi nitrito-nitrati appena scoperti.

Verranno perseguiti i seguenti obiettivi:

- caratterizzare il rilascio di ossido nitrico (NO) e specie nitrasanti dai lipidi nitrito-nitrati *in vitro* ed *in vivo* attraverso analisi biochimica, l'etichettatura isotopica e la spettrometria di massa. Saranno valutati gli effetti sull'assorbimento dei lipidi e sulla farmacocinetica delle specie lipidiche nitrito-nitrati;
- valutare la formazione di nitrito-nitrati nei siti di infiammazione e il loro ruolo come immuno-modulatori. La matrice lipidica di trigliceridi e fosfolipidi fornisce una piattaforma per la formazione *in vivo* di queste specie. Nuovi dati mostrano che il rilascio da membrane e depositi lipidici può svolgere un ruolo importante nella fisiologia e nella farmacologia degli acidi grassi nitrati. Questo sarà affrontato utilizzando modelli animali di infiammazione e fornirà una solida piattaforma per richiedere finanziamenti esterni.

Area Terapeutica: **MALATTIE ONCOLOGICHE**

Cancro ed Infiammazione

Sandra Cascio, Ph.D.

scascio@fondazionerimed.com

Breve descrizione

In questo progetto vogliamo testare l'ipotesi che la forma tumorale ed ipoglicosilata della Mucina 1 (MUC1) costituisca il link fra infiammazione e cancro. Al fine di studiare il ruolo pro-infiammatorio e pro-tumorigenico della forma aberrantemente glicosilata di MUC1, abbiamo usato topo transgenici che esprimono il gene umano per MUC1 (MUC1.Tg).

Recentemente abbiamo dimostrato che la presenza di MUC1 aggrava l'infiammazione cronica ed incrementa l'incidenza e progressione tumorale nel modello animale murinico. In particolare, abbiamo somministrato il carcinogeno AOM e l'agente infiammatorio DSS per indurre cancro nei siti di infiammazione.

Questo tipo di cancro è noto come "cancro associato alla colite" (CAC).

Nei tessuti di colon dei topi MUC1.Tg, caratterizzati da un'elevata infiammazione ed incidenza tumorale, sono stati riscontrati alti livelli di citochine pro-infiammatorie, fra cui TNF- α , and IL-6. Abbiamo deciso quindi di studiare la fonte di queste citochine. Dopo trattamento con AOM e DSS, abbiamo scoperto che, nel topo *wild-type*, IL-6 e TNF- α (Figure 1) erano prodotte solo dalle cellule infiammatorie, ed in particolare dai macrofagi. Nei topi MUC1.Tg, IL-6 e TNF- α , sono prodotte non solo dai macrofagi ma anche dalle cellule epiteliali intestinali (IECs).

Inoltre, l'infiammazione cronica promuove l'espressione della forma ipoglicosilata di MUC1 nelle IECs. Tale forma non è espresso nell'epitelio intestinale sano.

A sua volta, MUC1 ipoglicosilata si associa con p65 ed EzH2 e stimola l'espressione delle citochine infiammatorie nelle IECs. In conclusione, i nostri risultati hanno rilevato nuove basi molecolari del ruolo tumorigenico della proteina MUC1 nel CAC, instaurando un circuito a feedback positivo con le citochine infiammatorie.

Impatto

MUC1 è una proteina abbondantemente glicosilata e rappresenta uno dei principali componenti della mucosa del colon agendo come lubrificante e barriera protettiva dell'epitelio intestinale. Il grado di glicosilazione di MUC1, così come quello delle altre mucine, è centrale in questo ruolo di barriera difensiva intestinale. Quindi, alterazioni nei processi di glicosilazione di MUC1 comportano la riduzione della sua efficacia protettiva e rende l'epitelio suscettibile alla degradazione batterica. Il ripristino della barriera intestinale è quindi importante per prevenire la continua attivazione di una risposta immunitaria pro-infiammatoria nella lamina propria e l'amplificazione della infiammazione cronica nella malattia infiammatoria intestinale (IBD) and CAC.

Il nostro obiettivo è quello di svelare nuovi meccanismi molecolari che ci aiuteranno a determinare nuovi ed appropriati glicoforme MUC1 come biomarcatori che serviranno come fattori prognostici precoci per lo sviluppo di cancro al colon e che possono essere usati altresì per nuovi approcci terapeutici per i pazienti affetti da IBD.



Risultati raggiunti nel 2017

Tessuti infiammati e tumorali esprimono mucine con strutture glicaniche immature, ma come e perché le cellule epiteliali esprimano questi glicani così corti rimane ancora da capire. I nostri risultati suggeriscono che macrofagi che infiltrano i tessuti intestinali hanno la capacità di controllare l'espressione di queste forme alterate di MUC1 e di conseguenza sarebbero capaci di controllare la sua attività oncogenica. Modelli di co-coltura *in vitro* hanno confermato che i macrofagi differenziati in tipo 1 (M1) o tipo 2 (M2) inducono l'over-espressione delle forme glicosilate di MUC1 sulle cellule tumorali di colon HT-29. Inoltre, il profilo di espressione genica di glicosiltransferasi studiato sulle cellule HT-29 ha rilevato che i macrofagi modulano l'espressione di questi enzimi coinvolti nei processi di biosintesi dei glicani. Questo è il primo studio a livello internazionale in cui viene mostrato che il micro-ambiente possa modulare l'espressione delle mucine sulle IECs.

Conferenze

AACR Annual Meeting 2017, Aprile 2017, Washington, USA

Pubblicazioni

Cascio S, Faylo J.L., Sciarba J.C., Xue J, Ranganathan S, Lohmueller J.J., Beatty P.L. and Finn O.J. Abnormally glycosylated MUC1 establishes a positive feedback circuit of inflammatory cytokines, mediated by NF- κ B and EzH2, in colitis-associated cancer. *Oncotarget*. 2017; 8:105284-105298. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.22168>

Obiettivi per il 2018

L'obiettivo di questo progetto è comprendere i meccanismi con cui le cellule infiammatorie, ed in particolare i macrofagi, attivano la formazione di forme tumorali della proteina MUC1. È importante capire quali sono i fattori rilasciati da macrofagi che specificamente modulano tali cambiamenti. Usando tessuti infiammati e tumorigenici di colon di topi ci proponiamo di individuare queste nuove strutture di MUC1 tramite analisi di spettrometria di massa e risonanza magnetica. I risultati ottenuti saranno poi confermati nei tessuti di pazienti umani. Questo progetto porterà quindi all'individuazione di molecole che potranno essere usate in futuro per la cura dell'IBD e prevenzione del cancro al colon.

Area Terapeutica: MALATTIE ONCOLOGICHE

Identificazione del complesso MUC1/CIN85 come nuovo target terapeutico per inibire le metastasi

Sandra Cascio, Ph.D.

scascio@fondazionerimed.com

Breve descrizione

Il nostro gruppo ha identificato CIN85 (Cbl-interacting protein 85 KDa) come nuovo partner di MUC1 nei tumori. Il complesso MUC1/CIN85 è stato trovato sia negli stadi clinici precoci che avanzati dei tumori alla mammella, ovaio, colon e prostata. La co-localizzazione di MUC1 e CIN85 su strutture note come *invadopodia* aumenta i processi di invasione e migrazione delle cellule tumorali.

La nostra ipotesi è che prevenendo la formazione dei complessi CIN85/MUC1, così come dissociando i complessi già esistenti, si possano inibire i processi di invasione locale e prevenire metastasi ottenendo quindi tumori meno aggressivi o addirittura averne la scomparsa. Per testare questa ipotesi, abbiamo già identificato e testato due nuovi composti che hanno ridotto in maniera significativa l'associazione fra la forma ipoglicosilata di MUC1 e CIN85, ed hanno drasticamente inibito l'attività migratoria delle cellule epiteliali tumorali. Al momento stiamo studiando i meccanismi di trasmissione di segnale intracellulare dipendente dal complesso MUC1/CIN85. Quindi, questo progetto esplora il complesso CIN85/MUC1 complex come target terapeutico nel controllo della progressione tumorale e metastasi.

Impatto

La metastasi tumorale è responsabile dell'elevata mortalità causata dal cancro. La perdita della polarità epiteliale e la capacità di acquisire capacità migratorie ed invasive sono passaggi critici che permettono alla cellula tumorale di lasciare il sito primario di sviluppo della massa tumorale. In questo progetto il nostro obiettivo è quello di sviluppare e testare in un modello preclinico l'abilità di *small molecules* di ridurre l'invasione tumorale e metastasi. Il target di queste composti è appunto il complesso proteico CIN85/MUC1. Abbiamo già identificato due nuovi composti che negli esperimenti *in vitro* hanno inibito l'associazione di MUC1 con CIN85 così come hanno ridotto in maniera significativa l'attività migratoria delle cellule tumorali. Per convalidare il complesso CIN85/MUC1 come un nuovo target terapeutico svilupperemo e testeremo ulteriori composti. Se gli esperimenti *in vivo* confermeranno i risultati molto promettenti ottenuti *in vitro*, ci aspettiamo di ottenere diminuzione della crescita dei tumori e metastasi. Formuleremo anche dei composti farmaceutici ottimali da poter proporre in fase 1 dei *clinical trial* umani.

Risultati raggiunti nel 2017

Come detto prima, il nostro gruppo ha scoperto l'interazione fra la forma aberrantemente glicosilata di MUC1 e CIN85 che avviene nelle cellule tumorali sia murine che umane. CIN85 è una proteina multi-funzionale coinvolta in molte interazioni proteina-proteina. Un aspetto interessante, è che questo complesso è stato trovato su protusioni cellulari che abbiamo analizzato e confermato come *invadopodia*. Le *invadopodia* sono strutture fondamentali per i processi di invasione e migrazione

delle cellule tumorali. Abbiamo identificato due *small molecules* che inibiscono:

- l'interazione fra MUC1 e CIN85
- l'attività migratoria delle cellule tumorali dell'ovaio e della mammella.

Come ci si aspettava, esperimenti eseguiti su cellule epiteliali primarie sane, che non esprimono la forma tumorale di MUC1, queste *small molecules* non hanno avuto alcun effetto. Saggi di invasione *in vitro* hanno dimostrato che le due *small molecules* hanno l'abilità di ridurre la migrazione delle cellule tumorali alla mammella del 75% e delle cellule tumorali dell'ovaio del 69%. Come controllo abbiamo usato cellule sane che non hanno attività migratoria. Un primo set di esperimenti *in vivo* suggerisce che questi composti hanno l'abilità di ridurre le metastasi anche *in vivo*.

Conferenze

Ovarian Spore Retreat RPCI/UPCI, 2017, Buffalo, USA. Invited Speaker

Immunology/Comp Biology Retreat, 2017, Pittsburgh, USA. Invited Speaker

Pubblicazioni

Sandra Cascio, Michael Kvorjak, Raahul Sriram, Anda Vlad, Carlos Camacho and Olivera Finn. Identification of two drug compounds that by targeting the interaction between MUC1 and CIN85 inhibit migratory activities of breast and ovarian cancer cells. *In preparazione*

Obiettivi per il 2018

Uno degli obiettivi principali di questo progetto è appunto quello di confermare l'efficacia terapeutica nella inibizione delle metastasi di queste due *small molecules* che abbiamo testato fin'ora. A tal fine estenderemo il numero degli esperimenti *in vivo*. Useremo delle cellule murine speciali chiamate MKP derivanti da tumori murinici all'ovaio, che insorgono spontaneamente nei topi transgenici MUC1. In particolare, abbiamo selezionato due linee cellulari che presentano fenotipo diverso: una che deriva dal sito primario di sviluppo del tumore e non ha proprietà invasive, la seconda invece deriva da un sito secondario metastatico ed è altamente invasiva. Le linee cellulari tumorali verranno iniettati intraperitonealmente e dopo due-tre settimane i topi riceveranno le *small molecules* selezionate. Topi iniettati solo con cellule tumorali saranno usati come controllo negativo. Poiché queste linee cellule tumorali esprimono anche per la fluoresceina, la crescita tumorale e le metastasi potranno essere visualizzate misurate usando la tecnologia dell'*in vivo Imaging*. Inoltre basandoci sulla struttura chimica dei nostri composti, collaboreremo con il Dipartimento di Chimica Medicinale per disegnare, selezionare e testare ulteriori composti aventi attività farmacologica anti-metastatica ancora più potente.

Area Terapeutica: **MALATTIE ONCOLOGICHE**

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

Claudia Coronello, Ph.D.

ccoronello@fondazionerimed.com

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 altamente probabile che abbia già a disposizione un corredo di profili di espressione ricavato 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 cosa 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 2017

Nel 2017 ci siamo focalizzati sull'analisi dei profili di espressione di campioni ricavati dalla linea cellulare di carcinoma mammario MCF-7. Abbiamo usato la tecnologia RIP-Chip per identificare l'RNA associato alle proteine del complesso RISC, il complesso proteico che presiede alla funzionalità dei microRNA. In particolare abbiamo studiato due proteine, AGO2 e GW182. Con la tecnologia dei microarray abbiamo analizzato l'RNA del lisato totale e della frazione immunoprecipitata, con l'obiettivo di ottenere rispettivamente il profilo di espressione dell'RNA totale e dell'RNA arricchito in target del sistema di microRNA espresso nella linea cellulare MCF-7. Questi dati sono stati utilizzati per sviluppare due algoritmi:

- *RIP-Chip prediction*, utile per predire i geni differenzialmente espressi nel campione RIP-Chip. È basato su algoritmi di machine learning e utilizza solo variabili disponibili analizzando l'RNA totale, consentendo di trarre informazioni senza eseguire l'esperimento di RIP-Chip. Nel corso dello sviluppo di questo algoritmo sono emerse differenti caratteristiche legate alle due proteine AGO2 e GW182, che partecipano al complesso RISC con ruoli diversi.
- *DE.SSA*, utile per individuare i geni differenzialmente espressi dal confronto di due singoli campioni. Questo algoritmo apre le porte all'analisi personalizzata dei profili di espressione genica, perché consente di individuare i geni differenzialmente espressi senza l'utilizzo di repliche sperimentali.

Conferenze

Methods, tools & platforms for Personalized Medicine in the Big Data Era, NETTAB 2017 Workshop, Ottobre 2017, Palermo, ITA

Pubblicazioni

Coronnello C., Perconti G., Rubino P., Contino F., Bivona S., Feo S., Giallongo A. (2017) Detecting significant features in modeling microRNA-target interactions. *PeerJ Preprints*, 5:e3337v1

Perconti G., Contino F., Rubino P., Bivona S., Feo S., Giallongo A., Coronnello C. (2017) AGO2 and GW182 IP show different characteristics in co-immunoprecipitated RNA features. To be submitted to *BMC Bioinformatics*

Obiettivi per il 2018

I nostri studi sono stati finora focalizzati nella selezione degli attori della rete di interazioni tra microRNA e mRNA e nella individuazione delle caratteristiche di tali attori. Nel prossimo anno inizieremo ad utilizzare le informazioni ottenute per modellizzare la effettiva rete di interazioni. La principale difficoltà nel perseguire questo obiettivo consiste nel fatto che non esiste alcuna tecnica sperimentale che consente di "fotografare" e avere informazioni sull'intera rete di interazioni tra microRNA e mRNA. È solo possibile perturbare il sistema, ad esempio sovra-esprimendo o inibendo un microRNA, e rilevare in che modo il profilo di espressione dei target risulta modificato. Saranno quindi utilizzati data set selezionati dalla letteratura o appositamente generati nei nostri laboratori per testare le predizioni ottenute usando i modelli di rete di interazioni sviluppati. Si useranno i modelli di rete per predire gli effetti di una modifica del profilo di espressione, partendo da casi semplici, come la variazione dell'espressione di un singolo microRNA per arrivare a perturbazioni coinvolgenti l'intero sistema di microRNA, scenario più verosimile e presente nelle patologie tumorali. Inoltre, per testare ulteriormente gli algoritmi già sviluppati e ottenere più informazioni sull'attività del complesso RISC, sarà analizzata una terza proteina, AGO1, anch'essa coinvolta nell'attività regolatrice dei microRNA.

Area Terapeutica: **INSUFFICIENZE D'ORGANO**

Sindrome nephrotica e *zebrafish* come modello sperimentale

Chiara Cianciolo Cosentino, Ph.D.

ccianciolo@fondazionerimed.com

Breve descrizione

Questo progetto è iniziato nel 2016 in collaborazione con la Prof. Valérie Doye ed il suo team, all'istituto Jacques Monod, all'Università Paris Diderot. Le nucleoporine (Nups) sono proteine evolutivamente altamente conservate che formano il complesso del nucleoporo (*nuclear pore complexes NPCs*), grandi complessi macromolecolari avvolti nella membrana nucleare, importanti nel mediare il trasporto delle macromolecole fra il nucleo e il citoplasma. Oltre al trasporto nucleo-citoplasmatico, le nucleoporine sono coinvolte in molti altri processi cellulari fondamentali e alterazioni geniche di alcuni geni delle Nups sono state collegate a diverse malattie umane. Recentemente, mutazioni in alcune nucleoporine sono state legate alla sindrome nefrosica (*nephrotic Syndrome NS*) nell'uomo, una malattia renale causata da una disfunzione dei podociti del glomerulo, la quale porta a proteinuria, *hypoalbuminemia* e edema. In questo studio, abbiamo identificato una nuova nucleoporina coinvolta nello sviluppo della sindrome nefrosica. Il principale obiettivo di questo progetto è di studiare il ruolo delle nucleoporine nello sviluppo di questa malattia *in vivo*, utilizzando lo *zebrafish* come modello animale.

Impatto

Abbiamo dimostrato che mutazioni in alcune specifiche nucleoporine possono portare allo sviluppo di malattie renali. L'obiettivo principale di questa ricerca è di studiare i possibili meccanismi macromolecolari che portano allo sviluppo della sindrome nefrosica, offrendo in questo modo nuovi input per lo sviluppo di nuove possibilità terapeutiche.

Risultati raggiunti nel 2017

- Identificazione dei geni ortologhi in *zebrafish* di nucleoporine coinvolte nello sviluppo della sindrome nefrosica.
- Analisi dell'espressione genica (ibridazione *in situ*).
- Esperimenti di *knock-down* mediante l'utilizzo dei nucleotidi antisenso *morpholino*.
- Analisi funzionali del glomerulo e dei tubuli prossimali del pronefro nelle larve di *zebrafish* in seguito al *knock down*.
- Generazione di linee mutanti tramite la tecnica del CRISPR/Cas9 (Generazione F0 e F1).

Obiettivi per il 2018

- Analisi della morfologia dei podociti nel glomerulo tramite microscopia elettronica a trasmissione.
- Analisi funzionale del glomerulo *in vivo*.
- Rescue del fenotipo del *knock down* con diverse forme mutate di RNA.
- Screening, analisi morfologica e funzionale delle linee mutanti CRISPR/Cas9.
- Identificazione dei meccanismi molecolari che permettono a queste proteine di svolgere un ruolo specifico nei podociti del glomerulo renale.

Area Terapeutica: **INSUFFICIENZE D'ORGANO**

Identificazione e caratterizzazione di nuovi geni regolatori del simportatore Na^+/Cl^- apicale nel tubulo contorto distale del rene

Chiara Cianciolo Cosentino, Ph.D.

ccianciolo@fondazionerimed.com

Breve descrizione

Il simportatore Na^+/Cl^- apicale (thiazide-sensitive sodium-chloride cotransporter NCC) del tubulo contorto distale (DCT) del rene è una proteina canale di membrana che svolge un ruolo fondamentale nel controllo dell'omeostasi del rene e della pressione sanguigna, infatti mutazioni geniche in questo canale portano allo sviluppo di disordini elettrolitici e ipertensione. In questo studio, attraverso un'analisi trascrittomica di tipo comparativo abbiamo messo a confronto il trascrittoma nel tubulo contorto distale del topo e del suo equivalente in *zebrafish*, con lo scopo di identificare nuovi importanti geni regolatori di questo canale e fare luce sulla sua funzione.

Impatto

Lo scopo principale di questa ricerca è di studiare in dettaglio i meccanismi di controllo della crescita e la funzione del tubulo contorto distale del rene attraverso l'utilizzo di diversi approcci sperimentali in due diversi modelli animali, il topo e lo *zebrafish*. Lo studio di questi processi è importante non solo per una comprensione dettagliata della plasticità strutturale e funzionale del tubulo contorto distale del rene, ma anche per prevenire o curare le conseguenze patofisiologiche del malfunzionamento di questa struttura. Inoltre, questi studi forniranno una base per l'identificazione di nuovi approcci per lo studio nei topi e nello *zebrafish* dei meccanismi di signaling nel DCT.

Risultati raggiunti nel 2017

Attraverso un'analisi trascrittomica comparativa abbiamo identificato alcuni geni particolarmente abbondanti nel tubulo contorto distale dei mammiferi e dei teleostei. In breve, abbiamo generato una linea transgenica in *zebrafish* che esprime la proteina fluorescente *mcherry* sotto il controllo del promotore del gene simportatore Na^+/Cl^- apicale (NCC), espresso in maniera specifica nel corrispettivo in *zebrafish* del tubulo contorto distale del rene. L'espressione della proteina *mcherry* è stata poi utilizzata per isolare dal mesonefro dello *zebrafish* questo specifico segmento del nefrone, per effettuare analisi di RNA-seq. In seguito abbiamo confrontato il trascrittoma ottenuto in *zebrafish* con quello precedentemente pubblicato nel tubulo contorto distale del topo e abbiamo identificato un sottoinsieme di geni arricchiti in maniera specifica in questo segmento sia nei teleostei che nei mammiferi, fra i quali SLCs e numerosi fattori di trascrizione.

Questo è il primo report pubblicato sull'espressione genica globale in un segmento specifico del nefrone in *zebrafish*, un modello animale sempre più utilizzato nella ricerca sul rene.

Questo studio indica che l'analisi comparativa dell'espressione genica fra due specie animali filogeneticamente distanti può rappresentare un approccio utile per l'identificazione di nuovi geni importanti nella regolazione della funzione renale. Basandoci sui risultati di questi studi, abbiamo selezionato e testato il ruolo funzionale di due nuovi geni candidati, tramite il *knock down* con il morpholino e la creazione di linee mutanti tramite la tecnica del CRISPR/Cas9.

Conferenze

10th Annual Swiss Zebrafish Meeting. Gennaio 2017, Bern, CH

6th International Kidney.CH Symposium. Giugno 2016 J, Zurich, CH

Pubblicazioni

Sugano Y, Cianciolo Cosentino C, Loffing-Cueni D, Neuhauss SCF, Loffing J. Comparative transcriptomic analysis identifies evolutionarily conserved gene products in the vertebrate renal distal convoluted tubule. *Pflugers Arch*. 2017 Aug; 469 (7-8):859-867. doi: 10.1007/s00424-017-2009-8. Epub 2017 Jun 27. PMID: 28656378

Obiettivi per il 2018

- Screening delle due linee di mutanti.
- Analisi morfologiche e funzionali del rene nelle linee mutanti generate con il CRISPR/CAS9.

Questi esperimenti saranno affiancati con studi paralleli sugli stessi geni effettuati nei topi nel laboratorio del Prof Johannes Loffing, nell'istituto di Anatomia dell'Università di Zurigo.





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.

Area Terapeutica: **INSUFFICIENZE D'ORGANO**

Cellule dendritiche regolatorie nella prevenzione del rigetto di organo

Ester Badami, Ph.D.

ebadami@fondazionerimed.com

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. 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 *all-specifica*. Le DCreg sono cellule dendritiche capaci di indurre ipo-responsività delle cellule T del ricevente, specifiche per gli alloantigeni del donatore e di stabilire una tolleranza immunologica a lungo termine (memoria immunitaria). La risorsa di cellule sarà il perfusato epatico, ovvero il tampone di lavaggio del fegato ottenuto prima del trapianto.

Impatto

I pazienti trapiantati di organo solido sono soggetti ad immunoterapia soppressiva per 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 e problemi renali. 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 re-dirette, 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.

Risultati raggiunti nel 2017

L'indagine del fenotipo del perfusato di fegato ha rivelato che esiste una distinta popolazione di cellule Dendritiche compatibile con la definizione di cellule DC regolatorie. Queste cellule DCreg esprimono bassi livelli di molecole HLA-II e sono negative per molecole di co-stimolazione quali CD80, CD83 e CD40. Le DCreg sono variamente rappresentate nel perfusato epatico dei donatori sani, essendo tra il 5-30% della frazione cellulare del perfusato ed in un numero compreso tra 30-150 milioni di cellule immediatamente disponibili.

Obiettivi per il 2018

Isolamento delle cellule DC regolatorie dal perfusato epatico del donatore utilizzando anticorpi monoclonali specifici per il marker CD14 e coniugati a biglie magnetiche. Test funzionali per caratterizzare la capacità tollerogena delle cellule DC CD14+ appena isolate da perfusato epatico per testare la capacità di indurre iporesponsività nelle cellule CD3+ T del ricevente, provenienti dal sangue periferico, utilizzando test di proliferazione (Mixed Lymphocytes Reaction). Ottimizzazione della funzione immunosoppressoria delle cellule DCreg testando fattori di crescita specifici quali IL10 e Vitamin-D3.

Area Terapeutica: **INSUFFICIENZE D'ORGANO**

Terapia mediata da cellule NK nel tumore ed infezione cronica

Ester Badami, Ph.D.

ebadami@fondazionerimed.com

Breve descrizione

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

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, scompenza epatica, 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 2017

Nel presente studio è stato trovato 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 α] piuttosto che con il mix di citochine [IL2 + IL15] e [IL12 + IL18] oppure con la sola combinazione di [IL2 + IL15], più comunemente utilizzato nella attuale terapia cellulare, attiva le cellule NK conferendo un'attività anti-HCV ed anti-HCC superiore. L'attività antitumorale delle cellule NK attivate con IFN α è superiore non solo via aumentata citotossicità ma anche attraverso il rilascio di fattori solubili. Questi dati sono stati comprovati *in vitro* ed *in vivo* in un modello di infezione HCV su piccolo animale.

In questo studio è stato ottimizzato il protocollo di isolamento delle cellule NK su larga scala, nella prospettiva di un uso clinico, il che rappresenta un vantaggio rispetto alle procedure utilizzate nei trial clinici di terapie NK-mediate ad oggi note. Le cellule NK non vengono isolate dal sangue periferico ma dal perfusato epatico, dal quale possono essere ottenute molte più cellule. La possibilità di isolare grandi numeri di cellule NK contestualmente al trapianto di fegato rimane un vantaggio clinico e terapeutico insostituibile perché un trattamento tempestivo potrebbe effettivamente segnare una differenza nella prevenzione della recidiva HCV ed HCC post-trapianto.

Inoltre, le cellule NK provengono dal donatore del fegato e non da un terzo donatore, riducendo la possibilità di un possibile rigetto e aumentando la funzione delle cellule NK che migrando nel fegato, organo target, trovano un microambiente autologo.

Un ulteriore risultato è relativo alla stesura del protocollo animale da sottomettere all'OPBA dell'Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Sicilia, dove verranno eseguiti gli esperimenti delle prove di concetto *in vivo* per validare la funzione anti-tumorale delle cellule NK su un modello di topo HCC. Il protocollo è stato accettato dall'OPBA, prima, e dal Ministero della Sanità.

Studi preliminari hanno inoltre dimostrato che le cellule NK attivate con IFN α hanno una funzione anti-virale anche contro il virus Zika, non solo utilizzando come cellule target le Huh7.5 (linea cellulare di HCC), ma anche contro una linea cellulare di neuroblastoma infetta con Zika.

Conferenze

4th Conference of Translational Medicine on Pathogenesis and Therapy of Immune-mediated diseases, Marzo 2017, Palermo, ITA

Third CRI-CIMT-EATI-AACR International Cancer Immunotherapy Conference, Settembre 2017, Mainz, DE

MACS Day New Frontiers in Cellular Therapies, Ottobre 2017 Roma, ITA

ImmunoTherapy Bridge 2017, Novembre 2017, Napoli, ITA

Pubblicazioni

Giovanna Russelli; Paola Pizzillo; Gioacchin Iannolo; Floriana Barbera; Fabio Tuzzolino; Rosa Liotta; Mario Traina; Giovanni Vizzini; Bruno Gridelli; Ester Badami and Pier Giulio Conaldi "HCV replication in Gastrointestinal mucosa: potential extra-hepatic viral reservoir and possible role in HCV infection recurrence after liver transplantation". *PLoS One* (2017 Jul) 27;12(7):e0181683. Cited in 1 Impact factor 3.54

Alessia Gallo, Monica Miele, Ester Badami, Pier Giulio Conaldi. "Molecular and cellular interplay in virus-induced tumors affecting solid organ recipients" *Clinical immunology* (2018) – accepted

Duilio Pagano*, Ester Badami*, Pier Giulio Conaldi, Aurelio Seidita, Marco Barbàra, Fabrizio di Francesco, Alessandro Tropea, Rosa Liotta, Gaia Chiarello, Angelo Luca, Salvatore Gruttadauria. "Liver Perfusate Natural Killer Cells from Deceased Brain Donors and Prediction of Recurrence-free Survival after Liver Transplantation" to *Transplantation* - Submitted. Impact factor: 3,678

Badami E., Cexus O., Quarantino S. "Naturally arising antigen-specific Foxp3+CD4+CD25+ regulatory T cells fail to protect from spontaneous autoimmunity". *Nat Immunol* - Submitted. Impact factor: 20

Badami E., Barbera F., Vella S., Gallo, Coronello C., Carcione C., Conaldi P.G. "NK cell miRNOME signature in cancer and infection" (in preparation)

Proprietà intellettuale

Brevetto Internazionale n. PCT/EP2017/080848 "Immunoterapia NK-mediata e usi di essa".

Obiettivi per il 2018

- Caratterizzazione del miRNoma delle cellule NK attivate con IFN α o IL2/IL15 o IL12/IL18.
- Caratterizzazione del metaboloma del supernatante rilasciato dalle cellule NK attivate con IFN α o IL2/IL15 o IL12/IL18.
- Caratterizzazione dell'effetto anti-virale delle cellule NK su altri virus quali virus Zika.
- Prove di concetto *in vivo* della funzione anti HCV delle cellule NK su un modello di piccolo animale.
- Prova di concetto *in vivo* della funzione anti-tumorale delle cellule NK su un modello di HCC sul topo.

Area Terapeutica: **INSUFFICIENZE D'ORGANO**

Secretoma con potenziale uso clinico isolato da cellule umane fetali dermiche

Cinzia Chinnici, Ph.D.

cchinnici@fondazionerimed.com

Breve descrizione

Il secretoma derivato da cellule stromali mesenchimali (MSC) costituisce una terapia avanzata di tipo cell-free. La presenza di molecole ad azione immuno-modulatoria e riparatrice e di esosomi/microvescicole riscontrate nel secretoma consentirebbe il trattamento di varie patologie come le patologie cardiovascolari o neurodegenerative. Per la sua marcata azione proangiogenica, il secretoma delle cellule fetali dermiche (cellule di tipo stromali mesenchimali) sarebbe particolarmente indicato nel trattamento di patologie caratterizzate da angiogenesi "difettosa" o insufficiente, come le ferite di tipo cronico (ulcere).

Impatto

L'uso di prodotti cell-free avrebbe molteplici vantaggi rispetto alla terapia cellulare tradizionale. Attraverso la terapia a base di secretoma si potrebbero evitare o limitare i potenziali rischi legati alla somministrazione di cellule, come reazioni di rigetto, tumorigenicità, trasmissione di infezioni. Inoltre, il secretoma raccolto sotto forma di terreno condizionato si presterebbe ad essere preparato con largo anticipo per essere ready-to-use nel caso di patologie di tipo acuto che richiedono tempestività.

Risultati raggiunti nel 2017

Il secretoma viene raccolto sotto forma di terreno condizionato a partire dalle cellule in coltura. Pertanto, sono state stabilite le condizioni ottimali di raccolta basate sulla concentrazione dei fattori solubili ad azione riparatrice e proangiogenica in esso contenuti e sull'attività funzionale del terreno condizionato stesso. In particolare, l'analisi quantitativa dei fattori secreti ha evidenziato la presenza di molecole proangiogeniche e stimolanti il wound healing a concentrazioni elevate (> 1 ng/ml). La caratterizzazione funzionale in vitro ha evidenziato la capacità del terreno condizionato di indurre risposte biologiche associate al wound healing (migrazione cellulare e angiogenesi delle cellule target) con elevata efficienza e in modo dose-dependent. Inoltre, prove di stabilità (a 3 anni dal congelamento a -80°C) hanno evidenziato un'elevata stabilità del secretoma.

Conferenze

9th annual conference on Stem cells and Regenerative Medicine, Settembre 2017, Berlino, DE

Pubblicazioni

Chinnici C.M., Iannolo G., Amico G., Pagano V., Pietrosi G., Conaldi P.G., Mesenchymal stromal cells from human fetal liver release growth factors and chemokines with a potential role in liver tissue repair. Submitted and under revision Stem Cells Dev.

Chinnici C.M., Miceli V., Pampalone M., Lo Nigro A., Amico G., Conaldi P.G. *In vitro* evidences for epithelial to mesenchymal transition in low cell-density cultured human fetal hepatocytes, (2017), *Biochem. Biophys Res Comm.* 490: 472-479.

Gaetani M., Chinnici C.M., Carreca A.P., Di Pasquale C., Amico G., Conaldi P.G. Unbiased and quantitative proteomics reveals highly increased angiogenesis induction by the secretome of mesenchymal stromal cells isolated from fetal rather than adult skin, (2017), *J Tissue Eng Regen Med.* doi 10.1002/term.2417.

Pietrosi G. and Chinnici C. Report on liver cell transplantation by using human fetal liver cells. *Methods Mol Biol* 2017; 1506: 283-294

Obiettivi per il 2018

In genere, il terreno condizionato viene raccolto adoperando reagenti di tipo *research-* e non *clinical-grade*. Pertanto, allo scopo di produrre terreni condizionati *clinical-grade*, stiamo testando condizioni differenti per concentrare e liofilizzare il terreno condizionato stesso, verificando gli effetti di tali procedure su stabilità, contenuto proteico e funzionalità. Per esempio, il terreno condizionato prodotto come polvere liofilizzata potrebbe essere solubilizzato in reagenti *clinical-grade* (*Ringer's Lattato* o altro) nella prospettiva di accelerare un eventuale processo di certificazione di tipo *Advanced Therapy Medicinal Products* (ATMP). Inoltre, la polvere liofilizzata potrebbe essere risospesa in volumi diversi ottenendo concentrazioni diverse a seconda delle necessità specifiche.

Obiettivi ulteriori:

- definizione un sistema di rilascio del terreno condizionato per le applicazioni topiche *in vivo*;
- isolamento e caratterizzazione di vescicole extracellulari dal terreno condizionato (esosomi e/o microvescicole) per dimostrarne il ruolo nel processo di riparo del tessuto;
- produzione di cellule, terreni condizionati ed esosomi per uso clinico, in larga scala e secondo normative GMP (nella Cell Factory di ISMETT).

Area Terapeutica: **INSUFFICIENZE D'ORGANO**

Ingegnerizzazione di un rene all'interno di organi linfoidi secondari

Maria Giovanna Francipane, Ph.D.

mgfrancipane@fondazionerimed.com

Breve descrizione

Due milioni di persone al mondo sono affette da malattia renale allo stadio terminale (MRST), e il numero di pazienti diagnosticati con questa malattia aumenta ogni anno del 5-7%. I pazienti con MRST necessitano della terapia dialitica o di un trapianto renale per sopravvivere. Sebbene la dialisi sia un trattamento salvavita, non può essere un'opzione a lungo termine, in quanto garantisce solo il 10% della funzione renale. Viceversa il trapianto, garantendo il quasi completo recupero della funzione renale, rappresenta la terapia di elezione per i pazienti affetti da MRST. Purtroppo, nonostante la promozione della donazione di organi, le risorse disponibili in molti Stati non sono sufficienti a soddisfare le crescenti esigenze cliniche.

L'ingegneria tissutale offre un'alternativa alle tradizionali tecniche di trapianto d'organo, permettendo di rimediare alla carenza di organi donati. Quando la complessa struttura dei reni è distrutta dalla MRST, la terapia a base di cellule staminali non è in grado di rigenerare il tessuto danneggiato in maniera efficace. Al contrario, la rigenerazione dell'intero organo rappresenta un approccio terapeutico promettente per ripristinare la funzionalità renale nei pazienti con MRST. Sono state impiegate diverse strategie per l'ingegnerizzazione di un rene funzionale *de novo*, tra cui il ripopolamento di reni decellularizzati con cellule renali primarie o linee cellulari renali immortalizzate, e più recentemente, con cellule staminali/progenitrici. Sfortunatamente, questi approcci non sono stati in grado di generare tessuti renali vascolarizzati e perfusi, con funzionalità sufficiente da produrre urina ed eritropoietina.

Nel nostro laboratorio, abbiamo ideato un modello di ingegneria tissutale *in vivo* in cui cellule o tessuti sono impiantati in un linfonodo (LN) murino. A seguito di trapianto nel LN, i metanefri (abbozzi) murini mostravano strutture renali mature, tra cui glomeruli e tubuli funzionali, cellule secernenti eritropoietina, e producevano un fluido contenente urea. Guidati da questi risultati, ci siamo chiesti se un meccanismo cellulare/molecolare all'interno del LN supportasse lo sviluppo renale e se un rene *de novo* potesse essere rigenerato nel LN utilizzando nuovi candidati cellulari per l'ingegneria tissutale.

Impatto

Controversie sull'esistenza di una cellula staminale renale adulta sottolineano l'importanza di utilizzare cellule pluripotenti, cellule progenitrici isolate da reni fetali, o cellule renali adulte differenziate/riprogrammate, per l'ingegnerizzazione renale. Sono stati elaborati diversi metodi al fine di generare, a partire da queste cellule, abbozzi di organo tridimensionali - i cosiddetti organoidi. L'uso di organoidi per l'ingegnerizzazione di tessuti renali funzionali non è esente da difficoltà tecniche.

La vascolarizzazione è una delle sfide più significative da affrontare. Paradossalmente, la porzione sottocapsulare del rene murino - un sito di trapianto comunemente utilizzato nella prati-

ca sperimentale - non fornisce un ambiente favorevole per la vascolarizzazione e la maturazione funzionale degli organoidi. Al contrario, l'applicazione della tecnologia linfonodale permette l'incorporazione di un sistema vascolare all'interno degli organoidi trapiantati, un passo importante verso la modellazione dello sviluppo e della patologia renale umani.

Risultati raggiunti nel 2017

Precedentemente abbiamo dimostrato la formazione di tessuto renale funzionale murino attraverso il trapianto di abbozzi renali nel LN. I nostri dati più recenti mostrano anche la rapida re-vascolarizzazione e funzionalità di abbozzi renali umani in questo sito.

Il meccanismo di trasduzione del segnale indotto dal recettore $LT\beta R$ nelle cellule stromali linfonodali è critico per lo sviluppo e l'omeostasi del LN, e i nostri ulteriori studi - utilizzando diversi modelli murini *knockout* - suggeriscono che un simile meccanismo molecolare promuova l'integrazione vascolare del rene impiantato, sia nel LN che in un altro organo linfoide secondario, l'omento. Questa informazione potrebbe essere utile per il futuro sviluppo di sedi di trapianto artificiali in grado di ospitare e supportare cellule renali umane.

Conferenze

Presentazioni orali

Bioengineering a kidney in secondary lymphoid tissues: A $LT\beta R$ dependent pathway for ectopic organogenesis, M. G. Francipane, B. Han, L. Oxburgh, S. Sims-Lucas, C. Bates and E. Lagasse. ASN Kidney Week 2017, Novembre 2017, New Orleans, USA.

Poster

Bioengineering a kidney in secondary lymphoid tissues: the importance of the Lymphotoxin beta receptor pathway in tuning host-derived vascularization, M. G. Francipane, B. Han, L. Oxburgh, S. Sims-Lucas, C. Bates and E. Lagasse.

University of Pittsburgh 17th Annual Celebration of Science and Technology, Ottobre 2017, Pittsburgh, USA.

Polycystic Kidney Disease: Challenges, Differing Viewpoints and Ways Forward, FASEB Conference. Giugno 2017, Big Sky, USA.

Omental Milky Spots as Sites for Ectopic Liver Development, B. Han, J. Komori, M.G. Francipane, F. Chen and E. Lagasse. McGowan Institute for Regenerative Medicine – 16th Annual Scientific Retreat. Marzo 2017, Farmington, USA.

Rebuilding Renal Functions for Chronic Kidney Disease in Children. Pediatric Innovation Retreat, M. G. Francipane, B. Han, L. Oxburgh, S. Sims-Lucas, C. Bates and E. Lagasse. Gennaio 2017, Pittsburgh, USA.

Seminari

Bioengineering a kidney in secondary lymphoid tissues: the importance of the Lymphotoxin beta receptor pathway in tuning host-derived vascularization. Bridgeside Research Forum Seminar Series, Ottobre 2017, Pittsburgh, USA.

Premi

Travel award per la migliore presentazione. Bridgeside Research Forum Seminar Series. Dicembre 2017, University of Pittsburgh, USA.

Pubblicazioni

M. G. Francipane, and E. Lagasse. Regenerating a kidney in a lymph node. *Pediatric Nephrology*. 2016 Oct; 31(10):1553-60.

M. G. Francipane, and E. Lagasse. Towards organs on demand: breakthroughs and challenges in models of organogenesis. *Current Pathobiology Reports*. Springer. 2016 Sept; 4(3):77-85.

M. G. Francipane, and E. Lagasse. Pluripotent stem cells to rebuild a kidney: the lymph node as a possible developmental niche. *Cell Transplantation*. 2016 Jun; 25(6):1007-23.

M. G. Francipane, and E. Lagasse. The lymph node as a new site for kidney organogenesis. *Stem Cells Translational Medicine*. 2015 Mar; 4(3):295-307.

M. G. Francipane, and E. Lagasse. Maturation of embryonic tissue in a lymph node: a new approach for bioengineering complex organs. *Organogenesis*. 2014 December; 10(3):323-31.

In preparazione

M. G. Francipane, et.al. Bioengineering a kidney in secondary lymphoid organs: the importance of host lymphotoxin-beta receptor signaling for graft vascular integration.

Obiettivi per il 2018

Controversie sull'esistenza di una cellula staminale renale adulta sottolineano l'importanza di utilizzare cellule pluripotenti, cellule progenitrici isolate da reni fetali, o cellule renali adulte dedifferenziate/riprogrammate, per l'ingegnerizzazione renale. Sono stati elaborati diversi metodi al fine di generare, a partire da queste cellule, abbozzi di organo tridimensionali - i cosiddetti organoidi. L'uso di organoidi per l'ingegnerizzazione di tessuti renali funzionali non è esente da difficoltà tecniche. La vascolarizzazione è una delle sfide più significative da affrontare. Paradossalmente, la porzione sotto-capsulare del rene murino - un sito di trapianto comunemente utilizzato nella pratica sperimentale - non fornisce un ambiente favorevole per la vascolarizzazione e la maturazione funzionale degli organoidi. Al contrario, l'applicazione della tecnologia linfonodale permette l'incorporazione di un sistema vascolare all'interno degli organoidi trapiantati, un passo importante verso la modellazione dello sviluppo e della patologia renale umani.

Area Terapeutica: **INSUFFICIENZE D'ORGANO**

Caratterizzazione cellule mesenchimali ed epiteliali da placenta

Mariangela Pampalone

mpampalone@fondazionerimed.com

Leading Partner

IRCCS ISMETT, Palermo, ITA

Breve descrizione

Il progetto prevede la produzione e lo studio di cellule e loro derivati ottenuti dalla membrana amniotica della placenta umana per valutare il loro potenziale nell'ambito della medicina rigenerativa.

Impatto

Le cellule mesenchimali possono essere utilizzate in medicina rigenerativa, in terapia cellulare ed in ingegneria dei tessuti da sole o in associazione con biomateriali che funzionino da impalcatura. L'elevato potenziale proliferativo *in vitro*, il trofismo, la capacità antinfiammatoria in grado di ripristinare l'omeostasi tissutale ed in modo particolare la possibilità di differenziare e trans-differenziare verso cellule specializzate, se impiantate nel giusto contesto e microambiente, fanno sì che le MSC possano essere uno strumento per la rigenerazione e la riparazione di tessuti.

Risultati raggiunti 2017

Ottimizzazione del protocollo di estrazione delle cellule mesenchimali ed epiteliali per l'ottenimento di un elevato grado di purezza e vitalità del preparato finale. Produzione di cellule mesenchimali in 2D e 3D e valutazione della capacità immuno-modulatoria e dell'angiogenesi sia delle cellule cresciute in 2D e 3D sia dei rispettivi Mezzi Condizionati ed Esosomi. Valutazione della produzione di citochine pro ed anti infiammatorie e pro ed anti angiogeniche mediante Luminex. Applicazione delle cellule mesenchimali e di quelle epiteliali per lo studio di malattie del fegato (in collaborazione con ISMETT e Barcellona) e per il ricondizionamento del polmone.

Pubblicazioni

Chinnici CM., Miceli V., Pampalone M., Lo Nigro A., Amico G., Conaldi PG., In vitro evidences of epithelial to mesenchymal transition in low cell-density cultured human fetal hepatocytes (2017) *Biochem Biophys Res Commun.* Jun 15.

Obiettivi 2018

Caratterizzazione in termini di identità, purezza, potenza e tumorigenicità per la produzione e lo sviluppo di CBMP (*Cell-based medicinal products*).

Area Terapeutica: **MALATTIE INFETTIVE**

Sviluppo di un vaccino contro *Klebsiella pneumoniae*

Bruno Douradinha, Ph.D.

bdouradinha@fondazionerimed.com

Breve descrizione

Il progetto di ricerca è finalizzato allo sviluppo di un vaccino contro il *Klebsiella pneumoniae*. I potenziali antigeni saranno scelti usando un approccio di *reverse vaccinology*. Il nostro obiettivo è selezionare proteine che possano essere utilizzate in una strategia per prevenire la colonizzazione batterica e la conseguente infezione sistemica. Gli antigeni saranno clonati in ceppi batterici adeguati, espressi e purificati. Gli antigeni ricombinanti saranno caratterizzati a livello funzionale, biofisico e immunologico. Valuteremo il loro potenziale opsonofagocitico, il livello di protezione che riescono ad indurre in modelli murini di infezione da *K. pneumoniae* e biomarcatori immunologici relativi al controllo dell'infezione batterica. Speriamo di identificare antigeni adatti che possano essere inclusi in una strategia profilattica contro questo patogeno batterico resistente a molteplici farmaci.

Impatto

Attualmente, in Italia, il tasso di mortalità per infezione da ceppi di *K. pneumoniae* multi-resistente (produttori di carbapenemasi tipo KPC) in pazienti che ha subito un trapianto di cellule staminali allogeniche (SCT) è del 64,4%. La tendenza attuale non è quella di eseguire questo tipo di trapianto in pazienti positivi per *K. pneumoniae*, a causa dell'elevato tasso di fallimento. Infezioni con *K. pneumoniae* sono anche un grave problema nei pazienti che candidati al trapianto di organi solidi.

I nostri laboratori si trovano nell'Istituto Mediterraneo per i Trapianti e Terapie ad Alta Specializzazione (ISMETT), a Palermo, in Sicilia, una struttura sanitaria leader per le procedure di trapianto. All'ISMETT, i pazienti vengono sorvegliati regolarmente per l'infezione e/o colonizzazione intestinale da *K. pneumoniae*, a causa del suo impatto nel successo della procedura di trapianto e potenziali infezioni ulteriori di altri organi. Abbiamo identificato e seguito con successo casi di infezione da *K. pneumoniae*, distinguendo tra colonizzazione e infezione. Abbiamo anche osservato il trasferimento *in vivo* del gene bla-KPC-3 che conferisce resistenza ai carbapenemici tra *K. pneumoniae* e *E. coli* in pazienti che dovevano subire un intervento chirurgico, che sottolinea la necessità di una costante sorveglianza per evitare la diffusione di microrganismi multi-resistenti. Infatti, abbiamo fatto parte di reti nazionali multicentriche sia per infezioni nosocomiali sia per patogeni che possono compromettere il successo dei trapianti.

Risultati raggiunti nel 2017

Abbiamo identificato e clonato 6 potenziali proteine adesive di *K. pneumoniae* che svolgono un ruolo importante nei processi di adesione, ad esempio, quelli che compongono le fimbrie di questo patogeno (FimH, FimA, MrkD e MrkA) o coinvolti nella sua colonizzazione, come KPN_01507 e KPN_01508 da un isolato clinico *K. pneumoniae* ST512 appartenente alla banca di isolati da pazienti dell'IRCCS ISMETT. Stiamo ottimizzando i protocolli di purificazione di proteine e futuri saggi funzionali per caratterizzazione di questi antigeni. Queste proteine ricombinanti saranno usate anche come controllo negli esperimenti in cui si valuterà le capacità dei lieviti geneticamente ingegnerizzati per esprimere i suddetti antigeni.

Pubblicazioni

Di Mento G, Cuscino N, Carcione C, Cardinale F, Conaldi PG, Douradinha B, Emergence of a *Klebsiella pneumoniae* ST392 clone harbouring KPC-3 in an Italian transplantation hospital, *Journal of Hospital Infection*. In press.

Obiettivi per il 2018

Ci aspettiamo di identificare potenziali antigeni che possano integrare un futuro vaccino contro *K. pneumoniae*. È necessario un vaccino contro questo batterio multiresistente, poiché viene segnalata una resistenza sempre maggiore ai diversi trattamenti. I pazienti che devono sopportare periodi di recupero a medio-lungo termine in strutture sanitarie rischiano l'infezione da batteri multiresistenti, tra cui *K. pneumoniae*, che può causare gravi complicazioni a causa delle loro già debilitanti condizioni di salute. L'identificazione di entrambi i ceppi multiresistenti e ipervirulenti è preoccupante, poiché implica che questo patogeno possa infettare anche individui sani, spingendoli a considerarsi un problema di salute pubblica e non più limitati ai pazienti ospedalieri o agli individui immunodepressi. Pertanto, è perentorio che nuove strategie profilattiche siano sviluppate per aiutare a combattere *K. pneumoniae* e per evitare che diventi un problema di salute pubblica. Questo progetto è in linea con gli obiettivi proposti dal futuro Centro di Ricerca della Fondazione Ri.MED che sarà costruito vicino a Palermo, in Italia. Una delle attività principali previste per questo centro è lo sviluppo dei vaccini, quindi la strategia di vaccinazione suggerita rientra nei suoi scopi.

Area Terapeutica: **MALATTIE INFETTIVE**

Sviluppo di una nuova immuno-terapia contro *Klebsiella pneumoniae*

Bruno Douradinha, Ph.D.

bdouradinha@fondazionerimed.com

Breve descrizione

In questo progetto, si propone l'uso di ceppi probiotici di *S. cerevisiae* nell'ambito di una strategia volta a prevenire e a curare le infezioni da *K. pneumoniae*. I lieviti saranno geneticamente modificati per esprimere sulla loro superficie proteine coinvolte nell'adesione di *K. pneumoniae* a cellule umane. Ci si attende che questi lieviti ricombinanti, una volta somministrati, siano in grado di indurre una risposta immunitaria contro gli antigeni del batterio patogeno, agendo, così, come potenti vaccini mucosali. Parallelamente, questi lieviti probiotici competerebbero anche con *K. pneumoniae* per l'adesione alle cellule ed alle superfici mucosali, impedendo così la colonizzazione batterica e le conseguenti infezioni sistemiche. I lieviti geneticamente modificati saranno saggiati *in vitro* sulle cellule eucariotiche ed *in vivo* nei topi, per determinare sia la capacità di competere con *K. pneumoniae* per il legame alle cellule, sia il livello della risposta immune contro questi batteri.

L'immuno-terapia proposta funzionerebbe anche per i ceppi di *K. pneumoniae* multi-resistenti ai farmaci, in quanto i meccanismi che portano alla resistenza non permetterebbero di eludere la risposta immunitaria. Questo approccio sarà potenzialmente efficace contro *K. pneumoniae* e e costituirà un utile presidio per combattere questo patogeno farmaco-resistente.

Impatto

Attualmente, in Italia, il tasso di mortalità per infezione da ceppi di *K. pneumoniae* multi-resistente (produttori di carbapenemasi tipo KPC) in pazienti che ha subito un trapianto di cellule staminali allogeniche (SCT) è del 64,4%; La tendenza attuale non è quella di eseguire questo tipo di trapianto in pazienti positivi per *K. pneumoniae*, a causa dell'elevato tasso di fallimento. Infezioni con *K. pneumoniae* sono anche un grave problema nei pazienti che candidati al trapianto di organi solidi. I nostri laboratori si trovano nell'Istituto Mediterraneo per i Trapianti e Terapie ad Alta Specializzazione (ISMETT), a Palermo, in Sicilia, una struttura sanitaria leader per le procedure di trapianto. All'ISMETT, i pazienti vengono sorvegliati regolarmente per l'infezione e/o colonizzazione intestinale da *K. pneumoniae*, a causa del suo impatto nel successo della procedura di trapianto e potenziali infezioni ulteriori di altri organi.

Abbiamo identificato e seguito con successo casi di infezione da *K. pneumoniae*, distinguendo tra colonizzazione e infezione. Abbiamo anche osservato il trasferimento *in vivo* del gene blaKPC-3 che conferisce resistenza ai carbapenemici tra *K. pneumoniae* e *E. coli* in pazienti che dovevano subire un intervento chirurgico, che sottolinea la necessità di una costante sorveglianza per evitare la diffusione di microrganismi multi-resistenti. Infatti, abbiamo fatto parte di reti nazionali multicentriche sia per infezioni nosocomiali sia per patogeni che possono compromettere il successo dei trapianti.

Risultati raggiunti nel 2017

Abbiamo identificato e clonato 6 potenziali proteine adesive di *K. pneumoniae* che svolgono un ruolo importante nei processi di adesione, ad esempio, quelli che compongono le fimbrie di questo patogeno (FimH, FimA, MrkD e MrkA) o coinvolti nella sua colonizzazione, come KPN_01507 e KPN_01508 da un isolato clinico *K. pneumoniae* ST512 appartenente alla banca di isolati da pazienti dell'IRCCS ISMETT. Stiamo ottimizzando i protocolli di purificazione di proteine e futuri saggi funzionali per caratterizzazione di questi antigeni. Queste proteine ricombinanti saranno usate anche come controllo negli esperimenti in cui si valuterà le capacità dei lieviti geneticamente ingegnerizzati per esprimere i suddetti antigeni.

Pubblicazioni

Di Mento G, Cuscino N, Carcione C, Cardinale F, Conaldi PG, Douradinha B, Emergence of a Klebsiella pneumoniae ST392 clone harbouring KPC-3 in an Italian transplantation hospital, *Journal of Hospital Infection* (2018)

Obiettivi per il 2018

Con questo progetto vorremmo sviluppare una nuova immuno-terapia contro *K. pneumoniae* basata su lieviti probiotici geneticamente modificati per esprimere proteine con un ruolo nell'adesione di questo patogeno batterico e in grado di ridurre la sua colonizzazione. I ceppi probiotici saranno caratterizzati, non solo, per la capacità di indurre una risposta immunitaria umorale specifica contro questo batterio bensì per quella di stimolare la secrezione di chemochine importanti in grado di mantenere sotto controllo l'infezione batterica. L'immuno-terapia da noi proposta funzionerebbe anche per i ceppi di *K. pneumoniae* multiresistenti ai farmaci, in quanto i meccanismi che portano alla resistenza non riescono ad eludere la risposta immunitaria. Siamo convinti che questo nuovo approccio sarà efficace contro *K. pneumoniae* e che aiuterà a combattere questo patogeno farmaco resistente.

In ulteriori esperimenti verrà esplorata la capacità dei vaccini sperimentali di prevenire anche infezioni causate dai patotipi ipervirulenti, in particolare la meningite che ne è la manifestazione più grave. Anche, il nostro approccio sarà anche testato su altri modelli di colonizzazione di *K. pneumoniae*, come del tratto urinario e respiratorio. Inoltre, data l'importanza clinica di questo patogeno in persone immunodepresse, ad esempio, quelle che devono subire un trapianto, studieremo l'impatto della nostra strategia vaccinale in un modello murino di immunodepressione.

Area Terapeutica: **MALATTIE INFETTIVE**

Ceppi probiotici di *Saccharomyces cerevisiae* geneticamente modificati come potenti induttori di risposte immunitarie cellulari e mucosali contro l'HIV

Bruno Douradina, Ph.D.

bdouradina@fondazionerimed.com

Breve descrizione

Con questo progetto ci aspettiamo di ottenere una nuova strategia di vaccinazione contro l'HIV basata su ceppi probiotici di *S. cerevisiae* geneticamente trasformati. Supponiamo che un effetto sinergico tra la modulazione probiotica del sistema immunitario e l'immunità mucosa e la risposta immunitaria suscitata dall'espressione dell'HIV Gag fornirà un'ampia immunogenicità e protezione contro questo patogeno virale.

Impatto

La strategia di vaccinazione che proponiamo eviterebbe nuove infezioni, riducendo così i costi delle terapie antiretrovirali. Inoltre, la produzione e la manutenzione di lieviti probiotici geneticamente modificati sono molto economici, poiché i costi intrinseci di produzione e stoccaggio sono molto bassi. A causa dei bassi costi associati alla produzione di lieviti probiotici e alla possibile conservazione in forma liofilizzata senza perdere la loro efficacia, questa strategia di vaccinazione sarebbe ideale per essere utilizzata in aree che mancano di infrastrutture mediche e sanitarie in grado di mantenere in modo efficiente i lotti di vaccini e altri farmaci che devono essere conservati in un ambiente refrigerato. Inoltre, beneficerà anche la popolazione generale, comprese le aree più colpite in tutto il mondo. Allo stesso modo, il nostro approccio vaccinale proposto potrebbe essere esteso a tutti gli individui a rischio di infezione da HIV, sia nel mondo in via di sviluppo che in quello sviluppato, che contribuirebbe all'eradicazione di questa malattia. Infine, l'uso di lieviti probiotici geneticamente modificati come strategia di vaccinazione potrebbe essere applicato sinergicamente con un altro approccio simile attualmente in fase di sviluppo, che potrebbe comportare uno sviluppo più rapido di un vaccino più efficace contro l'HIV.

Risultati raggiunti nel 2017

Abbiamo geneticamente ingegnerizzato diversi ceppi di *S. cerevisiae*, sia probiotici che non-probiotici con un plasmide bicistronico che porta la sequenza dell'antigene dell'HIV Gag ottimizzato per l'espressione in questo lievito. Utilizzando il sistema AGA1p/AGA2p, abbiamo espresso con successo questo antigene virale sulla superficie di tutti i lieviti testati, come confermato dall'immunofluorescenza indiretta e dalla citometria a flusso. Inoltre, i ceppi geneticamente modificati erano ancora resistenti agli stress simulati dal GIT, indicando che la manipolazione genetica non ha compromesso la loro capacità di resistere a queste dure condizioni. Per i restanti test, abbiamo selezionato i due lieviti probiotici con un livello più alto di espressione di HIV Gag, *S. boulardii* e il veterinario *S. cerevisiae* Sc47 e *S. cerevisiae* BY4743 come controllo negativo, non probiotico. I lieviti trasformati sono stati fagocitati con successo da cellule dendritiche derivate da donatori

sani e hanno fatto maturare queste cellule immunitarie in una risposta immunitaria di tipo 1 (Th1), secondo i marcatori di superficie cellulare e le citochine secrete analizzate. È interessante notare che solo i ceppi probiotici trasformati con il plasmide che esprime Gag, sono stati in grado di indurre una risposta immunitaria specifica delle cellule T di memoria Gag utilizzando le cellule immunitarie derivate da un paziente HIV+ del *Multicenter AIDS Cohort Study (MACS)* dell'Università di Pittsburgh.

Conferenze

FEMS Microbiology Congress 2017, Luglio 2017, Valencia, (Spagna)

Obiettivi per il 2018

Matureremo cellule dendritiche (DCs) da pazienti sani e MACS HIV+ con lieviti trasformati e valuteremo i livelli di citochine secrete per caratterizzare il tipo di risposta immunitaria indotta dalla nostra strategia di vaccinazione. La capacità di indurre una risposta delle cellule T sarà misurata co-coltivando DC maturate con cellule T autologhe e quantificando il numero di cellule CD4 + e CD8 + che producono IFN- γ . Mentre le DC di donatori naïve determineranno se la maturazione con lieviti induce una risposta specifica contro la Gag, la maturazione delle DC da parte dei pazienti HIV+ confermerà se i lieviti possono stimolare una risposta di memoria. Verificheremo anche la capacità dei lieviti trasformati di indurre una risposta immunitaria *in vivo* usando un modello di topo umanizzato derivato da BLT, per confermare se l'immunizzazione con i lieviti che esprimono Gag stimola una risposta immunitaria cellulare specifica. I topi saranno immunizzati per via orale con i lieviti trasformati utilizzando un regime prestabilito. Verranno raccolti anche fluidi intestinali da topi immunizzati per via orale e valutati i livelli di IgG e sIgA specifici del Gag. Infine, i topi immunizzati, sia per via intraperitoneale che orale, saranno sfidati con particelle virali di HIV infettive e confrontati con controlli non immunizzati per valutare il livello di protezione mediato dai ceppi probiotici di *S. cerevisiae* che esprimono il Gag.

Area Terapeutica: **MALATTIE METABOLICHE**

Hsp10/EPF nel pancreas umano: possibile ruolo nella funzionalità delle isole di Langerhans

Simona Corrao, Ph.D.

scorrao@fondazionerimed.com

Breve descrizione

Il diabete di tipo 1 (T1D) è una patologia di origine autoimmunitaria, in cui le cellule produttrici di insulina (β cells) presenti nel tessuto endocrino del pancreas (isole di Langerhans) vengono drasticamente distrutte dal sistema immunitario. L'approccio più recente per la cura del diabete è basato sul trapianto di isole pancreatiche umane isolate da pancreas proveniente da donatori sani. Tuttavia, l'uso di farmaci immunosoppressivi può avere sui pazienti uno o più effetti collaterali. La *Heat Shock Protein* del peso di 10 kDa (Hsp10) è una *chaperone* molecolare coinvolta in attività intracellulari come il ripiegamento proteico e la tolleranza immunitaria nell'interfaccia materno-fetale in cui viene secreta come fattore solubile (chiamato *Early Pregnancy Factor* - EPF).

Le cellule staminali mesenchimali (MSCs) sono in grado di modulare la risposta immunitaria, risultando così come ottime candidate per le terapie cellulari in grado di controllare quelle condizioni in cui il sistema immunitario viene iperattivato. Gli scopi di questo progetto sono: primo, quello di esaminare i livelli di espressione ed i ruoli fisiologici dell'Hsp10/EPF sia in pancreas umani che in MSCs umane (hMSCs) derivate da diverse fonti (hMSCs da midollo osseo ed isole pancreatiche); e secondo, di ingegnerizzare le hMSCs a sovraesprimere l'Hsp10/EPF con lo scopo di generare una terapia immunosoppressiva cellulo-basata per essere potenzialmente utilizzate durante il trapianto delle isole.

Impatto

Questo progetto ha un impatto significativo sull'avanzamento degli approcci terapeutici relativi al T1D, più specificamente al trapianto delle isole pancreatiche, poiché fa parte di una nuova strategia per ridurre od eliminare la dipendenza da un deleterio regime post-trapianto immunosoppressivo. L'uso di MSCs (MSCs sovraesprimenti l'Hsp10) possono avere un forte impatto sul controllo del sistema immunitario dopo il trapianto delle isole attraverso l'induzione di uno stato di "tolleranza immunitaria" definitiva. Questo potrebbe migliorare e prolungare la funzionalità e la vita delle isole, evitando che i pazienti vadano incontro ai drastici effetti collaterali dovuti alla terapia immunosoppressiva.

Risultati raggiunti nel 2017

Come descritto nel Report Scientifico 2016, l'Hsp10, che condivide omologie strutturali con alcune proteine derivate da virus coinvolti nell'insorgenza del T1D, ha mostrato per la prima volta una corrispondenza con l'insulina, sia in termini di localizzazione che di intensità, e una marcata espressione nei pancreas umani non-diabetici sieropositivi per CMV/EBV, confrontati a quelli sieronegativi. Pertanto, l'Hsp10 potrebbe anche avere un ruolo nella modulazione delle funzioni delle cellule β , come il trasporto ed il rilascio dell'insulina. Per accertare la co-localizzazione dell'Hsp10 e dell'insulina e il possibile ruolo dell'Hsp10 nelle funzioni delle cellule β , altri campioni di pancreas umano sono stati usati per ulteriori analisi mediante immunofluorescenza. In

particolare, la co-localizzazione di Hsp10/insulina è stata analizzata in pancreas umani da diversi donatori sani e T2D. L'Hsp10 è localizzata all'interno delle isole in tutti i tre diversi donatori non diabetici e, in particolare, co-localizza nelle cellule β insieme con l'insulina. Tuttavia, la colorazione positiva è stata inoltre rilevata nel tessuto non-endocrino, suggerendo che l'Hsp10 potrebbe anche essere espressa dalle cellule esocrine.

Per confermare l'espressione dell'Hsp10 da parte di diverse popolazioni cellulari pancreatiche, il tessuto derivato dai pancreas digeriti è stato utilizzato per le analisi citofluorimetriche. Sia le cellule endocrine che quelle esocrine esprimono Hsp10, confermando i dati di immunofluorescenza.

L'Hsp10 inoltre è stata analizzata in pancreas provenienti da tre donatori diagnosticati come T2D. L'Hsp10 è stata localizzata sia nel tessuto endocrino, che in quello esocrino e, aspetto interessante, se ne è osservata una diminuzione nel corso della durata della patologia. Questo può suggerire il fatto che l'Hsp10 potrebbe essere coinvolta nel rilascio di insulina. Per sostenere questa ipotesi, l'Hsp10 è stata inoltre analizzata nelle isole pancreatiche umane trapiantate sotto la capsula renale dei topi 'nude' diabetici indotti da STZ.

L'esito dopo il trapianto è stato monitorato e si è visto che non tutte le preparazioni hanno avuto lo stesso effetto nel far retrocedere il diabete e questo sembrerebbe essere correlato con l'espressione dell'Hsp10 nelle cellule β . I risultati ottenuti potrebbero sostenere l'ipotesi di un possibile ruolo dell'Hsp10 nella funzionalità delle isole, nel metabolismo e nel rilascio di insulina. Poiché la corretta funzione delle isole è legata ad un adeguato supporto metabolico e all'ossigenazione, è stata anche presa in considerazione l'importanza dei vasi sanguigni. Inoltre, uno degli approcci più incoraggianti è l'uso terapeutico delle MSCs durante il trapianto delle isole nel trattamento del diabete di tipo 1. Pertanto, le caratteristiche immuno-modulatorie sono cruciali.

In questo studio, i pancreas dai donatori sani sono stati usati per l'analisi in cellule perivascolari (mediante immunofluorescenza e citofluorimetria) dell'espressione sia dell'Hsp10 che dell'HLA-G, perché entrambe le molecole sono coinvolte nella tolleranza immunitaria nell'interfaccia materno-fetale. Inoltre, lo stato infiammatorio può indurre le MSCs ad esprimere molecole protettiva con caratteristiche immuno modulanti. Di conseguenza, un esperimento preliminare su MSCs derivate da isole pancreatiche stimulate con citochine infiammatorie, quali IFN γ e TNF α , separatamente o combinati (*cytomix*) è stato condotto per valutare le variazioni nell'espressione dell'Hsp10, come molecola immuno-modulante. Il risultato ottenuto può suggerire un ruolo critico dell'equilibrio tra le citochine infiammatorie sia nello spazio extracellulare che intracellulare.

Tuttavia, una sola osservazione non è sufficiente e deve essere verificata e statisticamente provata con ulteriori esperimenti e utilizzando diverse fonti di MSCs, come il midollo osseo e le isole pancreatiche.

Conferenze

50th Miami 2017 Winter Symposium - Diabetes: Today's Research - Tomorrow's Therapies, Gennaio 2017, Hyatt Regency, Miami (USA)

Obiettivi per il 2018

- Stabilire le migliori fonti di hMSCs e la corretta combinazione di citochine necessarie per iniziare le MSCs ad indurre la sovraespressione dell'Hsp10.
- Analizzare *in vitro* gli effetti delle hMSCs "ingegnerizzate" sulla risposta immunitaria con e senza isole per una possibile applicazione nei modelli animali.

Area Terapeutica: **MALATTIE METABOLICHE**

Trapianto di Isole Pancreatiche

Mariangela Pampalone

mpampalone@fondazionerimed.com

Breve descrizione

È stata effettuata tutta la procedura necessaria per potere attivare l'attività clinica inerente la "processazione e utilizzo di cellule umane a scopo di trapianto". In particolare lo scopo del progetto è quello di effettuare il trapianto di Isole del Langherans in pazienti affetti da Diabete di Tipo I. Il diabete mellito di tipo 1 rientra nella categoria delle malattie autoimmuni causato dalla produzione di autoanticorpi che attaccano le cellule Beta che all'interno del pancreas sono deputate alla produzione di insulina.

Impatto

L'asportazione del pancreas intero può essere associata ad una serie di complicanze, ad un elevato rischio di ipoglicemie (nonostante il trattamento insulinico) ed alla carenza di ormoni importanti per il mantenimento della regolazione della glicemia, come ad esempio il glucagone. Il trapianto di isole pancreatiche offre vantaggi rispetto alla sostituzione in toto dell'organo, favorendo quindi un controllo della glicemia. Il processo comprende il prelievo di pancreas da donatore cadavere e successiva processazione finalizzata alla preparazione di isole pancreatiche per trapianto nei pazienti affetti da diabete mellito di tipo I. Al fine di raggiungere l'insulino-indipendenza esiste l'esigenza di trapiantare un numero sufficiente di insule che può anche essere ottenuto da più di un pancreas; il successo della terapia dipende dalla possibilità di preservare la massa insulare funzionale durante tutte le fasi che precedono e seguono il trapianto: preservazione fredda, ottimizzazione della procedura di isolamento, trapianto e *follow up* post-trapianto.

La procedura di isolamento rappresenta una fase critica in grado di influenzare il numero e la qualità del preparato finale destinato al trapianto. La stessa procedura di trapianto intraepatico contribuisce alla perdita di una cospicua massa di insule.

E' stato stimato che circa il 60% delle insule impiantate va incontro a morte cellulare subito dopo l'infusione intraportale a causa di una risposta infiammatoria aspecifica. Si può ovviare a questa criticità portando avanti, parallelamente all'attività di trapianto, una attività di ricerca sulle isole pancreatiche non idonee al trapianto che possa prevedere l'applicazione di sistemi biocompatibili in grado di preservare le isole dall'attacco immunitario.

Risultati raggiunti nel 2017

In seguito alla revisione e rimodulazione del Manuale di Qualità e di tutte le Procedure Operative Standard (SOPs) inerenti sia l'ottimizzazione del protocollo di isolamento sia la gestione dei locali CNT, sono stati raggiunti i seguenti risultati:

- Ottenimento Autorizzazione CRT per l'attività di prelievo, preparazione e trapianto di Isole Pancreatiche (Maggio 2017).
- Ottenimento Autorizzazione da parte dell'Istituto superiore di Sanità (Centro Nazionale Trapianti) ed avvio del programma di trapianto (Luglio 2017).

- Processazione di 6 pancreas di cui un preparato andato a trapianto il 3 Settembre 2017 ed un altro idoneo per il trapianto, non effettuato a causa del *cross match* positivo tra donatore e ricevente.

Obiettivi per il 2018

Effettuare almeno altri 3 trapianti nel 2018.

Riuscire ad ottenere l'autorizzazione per l'utilizzo delle Isole Pancreatiche non idonee al trapianto per la ricerca.

Area Terapeutica: **MALATTIE CARDIOVASCOLARI**

Studio della funzione delle globine nella rigenerazione del cuore di *zebrafish* e dello sviluppo embrionale

Paola Corti, Ph.D.

pcorti@fondazionerimed.com

Breve descrizione

Recentemente nuovi membri della famiglia delle globine, come la citoglobina (Cygb) e la globina X (Xgb), sono stati identificati nei vertebrati. Sebbene altamente conservata, la funzione di queste proteine rimane in gran parte sconosciuta. La scoperta più importante a questo riguardo è stata la scoperta che l'emoglobina può reagire con il nitrito e generare monossido di azoto (NO). Successivamente si è scoperto che la mioglobina è in grado di proteggere il cuore durante l'infarto miocardico attraverso la produzione di NO.

Nella ricerca corrente, si utilizza il modello *zebrafish* per definire il ruolo di queste nuove globine (Cygb1, Cygb2 e Xgb) nella rigenerazione del cuore di *zebrafish* e durante lo sviluppo embrionale. *zebrafish* è un modello consolidato e sempre più importante per lo studio dello sviluppo embrionale. Inoltre, il tessuto cardiaco è in grado di rigenerare in seguito all'amputazione di parte del ventricolo e quindi offre l'opportunità unica di scoprire i meccanismi molecolari coinvolti nella rigenerazione cardiaca.

L'obiettivo della mia ricerca è quello di caratterizzare il funzionamento delle globine nell'organismo e capire il loro ruolo *in vivo*. Nello specifico, questo progetto è sviluppato secondo le seguenti linee di ricerca:

- Studio della funzione delle globine e ruolo del nitrito sulla rigenerazione del cuore di *zebrafish*.
- Studio della citoglobina 2 nello sviluppo embrionale.
- Studio del ruolo della citoglobina 1 nella rigenerazione cardiaca.

Impatto

La citoglobina è stata scoperta nel 2002 e Globin X nel 2006 e ancora la funzione fisiologica di queste globine cellulari è sconosciuta. L'attuale consenso è che le globine funzionino attraverso le loro proprietà redox. In questo studio abbiamo scoperto nuove funzioni per Xgb e Cygb.

Xgb è una nitro-riduttasi con effetti anticoagulanti del nitrito nella rigenerazione cardiaca in *zebrafish*, favorevole ad un aumento della proliferazione dei cardiomiociti e neo-vascularizzazione del ventricolo. Cygb2 è importante durante lo sviluppo cardiaco nell'embrione nella trasduzione del segnale coinvolto nello stabilire una modellizzazione sinistra-destra nello sviluppo cardiaco. Questi effetti sulla proliferazione dei cardiomiociti e sullo sviluppo cardiaco hanno importanti implicazioni terapeutiche potenziali per le malattie cardiovascolari. Comprendere i meccanismi che regolano lo sviluppo e la rigenerazione cardiaca e, infine, ottenere l'accesso ai percorsi che consentono la modulazione di questi processi è un obiettivo a lungo termine che può portare a significativi progressi nello sviluppo di nuove terapie nel trattamento delle cardiopatie associate alla perdita di cardiomiociti.

Risultati raggiunti nel 2017

Xgb si trova nei globuli rossi del pesce e mostra proprietà anticoagulanti sulle piastrine umane in presenza di nitriti. Questi risultati sono pubblicati in un documento in PNAS (Corti et al., 2016). Abbiamo studiato il ruolo del nitrito e Xgb nel modello di rigenerazione del cuore di *zebrafish*

e abbiamo scoperto che l'esposizione al nitrito stimola il sistema immunitario e migliora il programma di rigenerazione del cuore aumentando la proliferazione dei cardiomiociti. In particolare, i macrofagi, i trombociti e i neutrofilo si accumulano in quantità elevate mentre i globuli rossi vengono eliminati più rapidamente nel sito della lesione. Ciò si traduce in un più alto tasso di neovascolarizzazione e miglioramento nella rigenerazione cardiaca. Inoltre abbiamo identificato un nuovo ruolo per Cygb nella trasduzione del segnale per stabilire l'asimmetria del cuore durante lo sviluppo embrionale. Questa scoperta stabilisce un nuovo paradigma per la funzione delle globine e stabilisce un ruolo centrale per cygb nello sviluppo cardiaco. Al fine di comprendere il ruolo di xgb e cygb nella rigenerazione e nello sviluppo cardiaco, utilizzando la tecnologia CRISPR / Cas9 per l'editing genico abbiamo generato mutanti *knock-out zebrafish* per xgb, cygb1 e cygb2. Siamo in procinto di stabilire la nostra linea zigotica materna al fine di comprendere il ruolo delle globine *in vivo*.

Conferenze

Nitric Oxide Gordon Research Conference. Invited Lecture *Globin X is a nitrite reductase*, Febbraio 2017, Ventura, USA.

SFRBM Annual Meeting, Poster presentations. *Interactions of zebrafish Cytoglobins with oxygen and nitric oxide and Nitrite improves zebrafish cardiac regeneration potentially via Cytoglobin 1,29* Novembre - Dicembre 2017, Baltimore, USA

Pubblicazioni

Corti P., Xue J., Tejero J., Wajih N., Sun M., Stolz D.B., Tsang M., Kim-Shapiro D.B., Gladwin M.T. (2016). Globin X is a six-coordinate globin that reduces nitrite to nitric oxide in the fish red blood cells. *PNAS* 113(30):8538-43. PMID: 27407144.

Amdahl M.B., Sparacino C.E., Watkins, Corti P., Gladwin M.T., Tejero J. (2017). Efficient Reduction of Vertebrate Cytoglobins by the Cytochrome b5/Cytochrome b5 Reductase/NADH System. *Biochemistry* 56(30):3993-4004. PMID: 28671819.

Rochon E., Corti P., Gladwin M.T. (2017). Hemoglobin lost in the lung: non-erythroid expression and putative functions of hemoglobin family members. Commentary on "Targeting pulmonary endothelial hemoglobin α improves nitric oxide signaling and reverses pulmonary artery endothelial dysfunction." *American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology*. In press.

Obiettivi per il 2018

La ricerca qui proposta studia la funzione biologica e i meccanismi di *signaling* molecolare delle globine con l'effetto del nitrito *in vivo*. Per la prima volta questa funzione sarà studiata nello sviluppo embrionale e l'effetto del nitrito sarà testato su un modello di rigenerazione del cuore di *zebrafish*. Riteniamo che queste indagini definiranno la funzione attualmente sconosciuta delle globine e riveleranno importanti intuizioni sul controllo degli eventi rigenerativi cardiaci. Vale la pena di ipotizzare che una più profonda conoscenza della rigenerazione del cuore di *zebrafish* avrà un impatto significativo sulla nostra comprensione della rigenerazione cardiaca dei mammiferi.



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 sta realizzando 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 permetterà 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 consentirà 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* e *population-specific*, offrendo al contempo nuovi strumenti di supporto nella pianificazione terapeutica e nel processo decisionale pre-intervento.

Area Terapeutica: **MALATTIE CARDIOVASCOLARI**

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

Gaetano Burriesci, Ph.D.

gburriesci@fondazionerimed.com

Leading Partner

University College London, UK

Breve descrizione

Le valvole cardiache bioprotetiche normalmente cedono perché accumulano depositi di calcio che ne indeboliscono i lembi, causando strappi o bloccando l'apertura della valvola. Sia il mondo della ricerca che l'industria biomedicale hanno a lungo cercato di ottenere valvole cardiache bioprotetiche non soggette alla calcificazione, per renderle utilizzabili nei pazienti più giovani, evitando loro la necessità di assunzione continua di anticoagulanti. Tuttavia, finora i trattamenti anti-calcificanti sviluppati non si sono dimostrati efficaci negli adulti più giovani. Il nostro gruppo di ricerca ha identificato una forma di infiammazione stimolata dal sistema immunitario, che accelera 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 negli animali e presente sul tessuto bioprotetico. Per bloccare questa infiammazione immunitaria, abbiamo generato maiali geneticamente modificati, inibendo la produzione di Gal; e abbiamo dimostrato che questo tessuto privo di Gal ha una calcificazione fortemente rallentata. Adesso stiamo usando il pericardio estratto da questa nuova classe di animali per sviluppare una valvola cardiaca bioprotetica resistente alla calcificazione, che possa essere utilizzata su una popolazione più ampia e migliorare la qualità della vita dei soggetti che la ricevono.

Impatto

Ogni anno vengono eseguite nel mondo circa 300000 sostituzioni di valvole cardiache. Le tipologie di protesi disponibili si distinguono in due categorie principali, le valvole cardiache meccaniche che richiedono una terapia anticoagulante cronica, e le valvole cardiache biologiche, più biocompatibili. Queste ultime utilizzano lembi biologici, normalmente estratti dalle valvole cardiaca umane o suine, o pericardio animale.

Le valvole biologiche sono preferite nei pazienti più anziani (> 60 anni), dove risultano sufficientemente durevoli. Al contrario, i soggetti più giovani ricevono solitamente valvole meccaniche, in quanto le valvole biologiche vi cederebbero rapidamente per via di meccanismi degenerativi legati dall'età. In particolare, nel 100% dei pazienti di età inferiore ai 35 anni viene riportato un livello 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 2017

Abbiamo già verificato che sia il tessuto geneticamente modificato sia quello standard del maiale hanno la stessa morfologia generale ed il medesimo contenuto di collagene. Anche test di resistenza strutturale a carico di trazione uniassiale e di ritenzione della sutura hanno dimostrato che i tessuti sono meccanicamente equivalenti. Prototipi di valvole cardiache realizzati con i due tessuti, progettati e sviluppati nel nostro *team*, hanno dimostrato che il tessuto geneticamente alterato e standard forniscono una vita stimata simile e mostrano modalità di cedimento analoghe.

La valutazione acuta *in vitro* e *in vivo* ha indicato un'idrodinamica eccellente ed equivalente per i due tessuti (secondo la normativa ISO 5840: 2015). I test di durata sono attualmente in corso, ma hanno già dimostrato il potenziale del dispositivo proposto di soddisfare i requisiti di durata previsti dalla normativa internazionale.

Conferenze

Physical and hydrodynamic equivalency of wild type and alfa-gal free GTKO porcine pericardium; a new source material for bioprosthetic heart valves, McGregor, C., Byrne, G., Rahmani, B., Chisari, E., Kyriakopoulou, K., Burriesci, G. *Heart Valve Society Meeting*, Marzo 2017, Montecarlo, MCO

Pubblicazioni

McGregor, C., Byrne, G., Rahmani, B., Chisari, E., Kyriakopoulou, K., Burriesci, G. (2016) Physical equivalency of wild type and Galactose α 1,3 Galactose free porcine pericardium; a new source material for bioprosthetic heart valves. *Acta Biomaterialia* 41:204–209

Proprietà intellettuale

Burriesci, G., Rahmani, B., Byrne, G., McGregor, C. (2016) Bioprosthetic heart valve. Application Number: GB1612180.8

Obiettivi 2018

Ogni anno vengono eseguite nel mondo circa trecentomila sostituzioni di valvole cardiache. A tale scopo, sono attualmente disponibili due tipi di protesi, le valvole cardiache meccaniche, che richiedono una terapia anticoagulante cronica, e le valvole cardiache bioprotesiche, realizzate con tessuti biologici, normalmente costituiti da lembi valvolari umani o porcini o da pericardio animale. Le valvole cardiache bioprotesiche sono preferite nei pazienti più anziani ultrasessantenni) dove garantiscono durate superiori. I pazienti più giovani ricevono generalmente valvole meccaniche, a causa della rapida degenerazione delle valvole cardiache bioprotesiche che si verifica nei pazienti giovani. Nei soggetti sotto i trentacinque anni, il deterioramento strutturale della valvola avviene entro 5 anni nel 100% dei casi. Valvole cardiache bioprotesiche più durevoli rappresenterebbero un forte progresso nello standard terapeutico, eliminando la necessità di anticoagulazione nei soggetti più giovani ed espandendo l'accesso a questa terapia più vantaggiosa ad un vasto gruppo di pazienti.

Area Terapeutica: **MALATTIE CARDIOVASCOLARI**

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

Gaetano Burriesci, Ph.D.

gburriesci@fondazionerimed.com

Breve descrizione

Al fine di migliorare la pianificazione terapeutica e l'esito dei trattamenti valvolari, è essenziale una maggiore comprensione delle implicazioni associate con le alterazioni emodinamiche prodotte dalle patologie dei distretti valvolari e dalle relative correzioni terapeutiche (come le valvole chirurgiche e transcateretere). I recenti sviluppi nell'area dell'ingegneria computazionale, della fluidodinamica sperimentale e della diagnostica per immagini possono sostanzialmente contribuire ad raggiungere una concezione più adeguata del fenomeno, superando i limiti nella risoluzione temporale e spaziale delle singole tecniche.

Impatto

Il nostro obiettivo finale consiste nella valutazione della dinamica del flusso per diversi dispositivi valvolari, fenotipi anatomici e situazioni patologiche. Questo passaggio è essenziale per migliorare la sicurezza e l'efficacia delle terapie valvolari ed estrarre informazioni di supporto nella selezione della soluzione clinica più adatta a ciascun paziente. Inoltre, la tecnologia sviluppata consentirà lo sviluppo di cure valvolari e dispositivi medici di nuova generazione.

Risultati raggiunti nel 2017

I nostri studi hanno dimostrato che approcci procedurali e dispositivi medici specifici (come le valvole transcateretere) possono produrre variazioni significative del flusso sanguigno, che potrebbero portare a prestazioni subottimali e/o alla maggiore incidenza di eventi ischemici.

Conferenze

Fluid-structure-interaction model of Transcatheter Aortic Valve Implantation configuration: comparison with an in-vitro study, Tango, A.M., Ducci, A., Burriesci, G. *7th International Conference on Computational Bioengineering*, Settembre 2017, Compiègne, FRA.

Blood flow triple-imaging, Annio, G., Ducci, A., Burriesci, G., Torii, R. *7th International Conference on Computational Bioengineering*, Settembre 2017, Compiègne, FRA.

Pubblicazioni

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. (2017) Anatomically realistic ultrasound phantoms using gel wax with 3D printed moulds. *Physics in Medicine and Biology* DOI: <https://doi.org/10.1088/1361-6560/aa9e2c>

Capelli, C., Corsini, C., Biscarini, D., Ruffini, F., Migliavacca, F., Kocher, A., Laufer, G., Taylor, A.M., Schievano, S., Andreas, M., Burriesci, G., Rath, C. (2017) Pledget-armed sutures affect the hemodynamic performance of biologic aortic valve substitutes: a preliminary experimental and computational study. *Cardiovascular Engineering and Technology* 8(1):17-29.

Obiettivi per il 2018

L'obiettivo principale del progetto consiste nel comprendere le implicazioni cliniche dell'alterazione del flusso sanguigno prodotto dalle valvole bioprotesiche chirurgiche e transcateretere, al fine di migliorare la pianificazione terapeutica e l'esito dei trattamenti. Ciò comporta l'uso combinato di tecniche sperimentali che identifichino i fenomeni, con simulazioni numeriche che amplino e generalizzino i risultati, semplificandone il potenziale uso clinico.

Area Terapeutica: **MALATTIE CARDIOVASCOLARI**

Analisi dell'appendice atriale sinistra per predire il rischio di trombosi

Gaetano Burriesci, Ph.D.

gburriesci@fondazionerimed.com

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 l'evento tromboembolico 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 conosciuto.

Impatto

Lo studio conferma l'ipotesi che la morfologia dell'appendice atriale sinistra sia un fattore principale nella patologia, rendendo alcuni pazienti con fibrillazione atriale più a rischio, a seconda delle loro caratteristiche anatomiche.

L'approccio presentato si presta a diventare un potente strumento per analizzare quantitativamente parametri impossibili da misurare clinicamente, e per studiare i fattori geometrici che influenzano la formazione di trombi. Infine, la metodologia proposta ha evidenziato un forte potenziale nell'assistere nella stratificazione clinica dei pazienti ad alto rischio di formazione di trombi, indirizzando la selezione di terapie individualizzate che migliorino la sicurezza e lo standard di cura del paziente.

Risultati raggiunti nel 2017

Sono state implementate analisi di fluido-dinamica computazionale basate su modelli anatomici paziente-specifici in quattro casi rappresentativi delle morfologie più comuni dell'appendice atriale sinistra. Sono state effettuate simulazioni transitorie, permettendo al flusso di svilupparsi. Queste si sono utilizzate per stimare il tempo di permanenza del flusso sanguigno nelle diverse regioni dell'appendice, in condizioni normali e in presenza di fibrillazione atriale. I risultati evidenziano l'effetto della morfologia dell'appendice sul flusso sanguigno e sulle alterazioni emodinamiche prodotte in presenza di fibrillazione atriale.

Conferenze

Computational Fluid Dynamic Analysis of the Left Atrial Appendage to Predict Thrombosis Risk, Bosi, G.M., Cook, A., Rai, R., Menezes, L., Schievano, S., Torii, R., Burriesci, G. *7th International Conference on Computational Bioengineering*, Settembre 2017, Compiègne, FRA.



Obiettivi per il 2018

Sarebbe necessario un numero molto maggiore di casi paziente- specifici per chiarire meglio e generalizzare la relazione tra la morfologia dell'appendice atriale sinistra e il comportamento emodinamico che innalza il rischio di formazione di trombi. Altre simulazioni verranno eseguite in e i risultati saranno validati da esperimenti disegnati allo scopo.

Area Terapeutica: **MALATTIE CARDIOVASCOLARI**

Sviluppo di una valvola aortica transcateretere innovativa

Gaetano Burriesci, Ph.D.

gburriesci@fondazionerimed.com

Breve descrizione

La sostituzione chirurgica della valvola aortica, che in passato ha rappresentato un trattamento efficace, non è più ideale per la nuova classe di pazienti. Infatti, la più comune malattia valvolare è adesso la 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 comorbidità 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/sostituzione transcateretere della valvola aortica (TAVI o TAVR) 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 e più affidabile a un costo notevolmente inferiore. Inoltre, la possibilità di impiantare il dispositivo in anatomie non calcifiche, dimostrata dai test su modello animale, indica importanti 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 2017

La ricerca condotta nell'ambito di questo progetto ha portato all'ottimizzazione progettuale e alla prototipazione di un nuovo dispositivo TAVI che soddisfa i requisiti iniziali.

In particolare, sono stati sviluppati tre modelli di valvole di dimensioni nominali pari a 23, 26 e 29 mm, ottimizzati in termini di prestazioni strutturali e fabbricazione.

I test funzionali e idrodinamici hanno confermato che la soluzione sviluppata offre prestazioni idrodinamiche confrontabili o superiori rispetto ai principali dispositivi concorrenti attualmente sul mercato, grazie a una significativa riduzione dei trafiletti paravalvolari. Le prestazioni dei prototipi soddisfano i requisiti richiesti nello standard internazionale ISO 2840-3:2013. Il delivery system per il caricamento e il rilascio della valvola è stato progettato e realizzato. Gli impianti acuti



su animale hanno confermato che l'impianto della valvola sviluppata è facile da effettuare; il dispositivo è ritraibile e può essere riposizionato a impianto completo; le valvole selezionate in maniera adeguata hanno buone prestazioni emodinamiche, con una buona dinamica dei lembi, stenosi minima, rigurgito ridotto e nessuna interferenza con il flusso sanguigno coronarico. Test *in vitro* di durata hanno dimostrato che la tecnologia proposta può garantire e superare abbondantemente i requisiti di vita utile richiesti per le valvole artificiali a lembi flessibili (200 milioni di cicli).

Conferenze

Barts Heart Valve Program Symposium Aortic stenosis current and future practice - *Developing new valve technology - an engineering perspective* - Novembre 2017, London, UK

Translational Research Symposium - 28° European Society for Biomaterials Annual Conference - *Reimagining transcatheter heart valves* - Settembre 2017, Athens, GR

Pubblicazioni

Rahmani, B., Tzamtzis, S., Sheridan, R., Mullen, M.J., Yap, J., Seifalian, A.M., Burriesci, G. (2017) In-Vitro Hydrodynamic Assessment of a New Transcatheter Heart Valve Concept (The TRISKE-LE). *Journal of Cardiovascular Translational Research* 10(2):104-115.

Proprietà intellettuale

- Burriesci, G., Tzamtzis, S., Seifalian, A. M. (2017) Prosthesis delivery system. Patent US9597211 B2
- Burriesci, G., Tzamtzis, S., Seifalian, A. M. (2017) Prosthesis delivery system. Patent EP2629700 B1
- Burriesci, G., Tzamtzis, S., Mullen, M. J., Seifalian, A., Yap, J. (2017) Vascular implant. Patent EP3043746 B1

Obiettivi 2018

Il progetto originariamente finanziato è stato completato con successo, ottenendo una solida validazione della tecnologia proposta. Il nostro obiettivo principale è ora di acquisire supporto per effettuare la valutazione cronica su animali e attrarre l'interesse di partner industriali, per agevolare il trasferimento tecnologico ed accedere al mercato.

Area Terapeutica: **MALATTIE CARDIOVASCOLARI**

Sviluppo di una valvola mitrale transcateretere innovativa

Gaetano Burriesci, Ph.D.

gburriesci@fondazionerimed.com

Breve descrizione

La sostituzione valvolare con impianto transcateretere consente di posizionare una valvola artificiale in posizione ortotopica, attraverso un catetere inserito da un vaso periferico. Questa tecnica evita la necessità di un intervento a cuore aperto ed elimina alcuni dei principali rischi associati alle operazioni invasive convenzionali, come la necessità di arresto/riavvio cardiaco o i danni causati dalle macchine cuore-polmone. Pertanto, tale soluzione è particolarmente adatta a tutte le categorie di pazienti attualmente esclusi dalla pratica chirurgica. Questo approccio si è già affermato come terapia principale per i pazienti ad alto rischio che soffrono di stenosi aortica. Tuttavia, la sostituzione percutanea della valvola mitrale è ancora lontana dall'essere una procedura consolidata, a causa delle maggiori difficoltà tecniche associate alla valvola atrio-ventricolare. L'obiettivo di questo progetto è sviluppare un nuovo dispositivo protesico adatto alla sostituzione mitrale transcateretere. Ciò rappresenterebbe un importante contributo allo sviluppo di un trattamento più sostenibile.

Impatto

Il rigurgito mitralico è una delle principali patologie della valvola mitrale che portano allo scompenso cardiaco. I pazienti con rigurgito mitralico sintomatico severo hanno un tasso di sopravvivenza molto basso in assenza di interventi correttivi. Tuttavia, solo una piccola percentuale dei pazienti affetti da rigurgito mitralico funzionale, e circa la metà di quelli affetti da rigurgito mitralico degenerativo, è attualmente giudicata idonea a sostenere correzioni chirurgiche, a causa dell'alto rischio della procedura. L'impianto transcateretere mini-invasivo può ridurre i rischi in questi pazienti e offrire una terapia alternativa più sostenibile per le malattie della valvola mitrale. Rispetto alle altre valvole mitrali transcateretere in fase di sviluppo, il dispositivo proposto in questo progetto migliora il posizionamento e l'interazione del dispositivo con le strutture anatomiche circostanti. La valutazione *in vitro* ha fornito una valida validazione della tecnologia proposta, e la fase successiva comporterà il completamento della valutazione pre-clinica *in vivo*, necessaria prima della fase clinica.

Risultati raggiunti nel 2017

Nell'ambito di questo progetto, è stata sviluppata una nuova valvola mitrale transcateretere, costituita da due lembi di pericardio bovino progettati per garantire la corretta funzionalità in svariate configurazioni di impianto e una cuffia di tenuta, sostenuti da una struttura a filo, ottimizzata per minimizzare le sollecitazioni. Il dispositivo ha soddisfatto i requisiti di prestazione previsti dallo standard internazionale ISO 5840-3:2013, dimostrando la sua validità come valvola artificiale per il trattamento del rigurgito mitralico. I prototipi della valvola mitrale



transcatetere hanno attualmente raggiunto ottanta milioni di cicli. Si anticipa che il dispositivo sviluppato potrà rappresentare una valida alternativa alle tecniche di riparazione transcatetere e, grazie alla sua affinità strutturale con l'anatomia della valvola mitrale umana, potrebbe offrire un'opzione più appropriata rispetto alle altre valvole transcatetere circolari in fase di sviluppo.

Pubblicazioni

Bozkurt S., Preston-Maher G.L., Torii R., Burriesci G. (2017) Design, Analysis and Testing of a Novel Mitral Valve for Transcatheter Implantation. *Annals of Biomedical Engineering* 45(8):1852-1864.

Proprietà intellettuale

Burriesci G., Bozkurt, S., Rahmani, B., Mullen, M.J. (2016) Prosthetic heart valve. Patent WO2016203241 A1

Obiettivi per il 2018

Attualmente, stiamo pianificando la valutazione su animale con il dispositivo sviluppato in questo progetto. In caso di successo, si otterrebbe un'essenziale conferma della sicurezza e dell'efficacia della soluzione proposta, stimolando il trasferimento verso l'applicazione clinica.

Area Terapeutica: **MALATTIE CARDIOVASCOLARI**

Valvole cardiache ingegnerizzate (TEHV)

Antonio D'Amore, Ph.D.

adamore@fondazionerimed.com

Breve descrizione

TEHV: sviluppare tessuti artificiali ed endoprotesi valvolari per la sostituzione e riparazione di valvole cardiache.

Impatto

Introduzione di strategie e tecnologie innovative di sostituzione e riparazione di valvole cardiache.

Risultati raggiunti nel 2017

Risultati scientifici:

Introdotta tecnologia innovativa per fabbricare valvole polimeriche biomimetiche riprodotte struttura e funzione delle valvole native. Dimostrata capacità di replicare meccanica planare, meccanica a flessione, geometria e dimensione delle valvole cardiache native alla macro e micro-scala. Iniziata valutazione *in vivo* su cavia di larga taglia della relativa IP.

Sviluppata nuova IP per la biofabbricazione di corde tendinee. Esteso il piano di caratterizzazione di tessuti cardiaci nativi includendo: valvole cardiache, miocardio, coronarie, corde tendinee. Ottenuta autorizzazione ed accesso a campioni umani da donatore per caratterizzato fisiologia avanzata di valvole cardiache. Consolidato OneValve IP portfolio. Simulazione numerica di mitrale con corde tendinee, progetto in collaborazione con Dr. Pasta.

Finanziamenti ottenuti:

(2016-2017) Coulter foundation 2016 \$100,000. Assessment of acute response to: polyurethane, stentless, multi-leaflet mitral valve; on porcine model. Co-PI: V. Badhwar, Co-PI: A. D'Amore, Co-PI: W. Wagner, University of Pittsburgh;

(2016-2017) Clinical & Translational Science Institute (CTSI), University of Pittsburgh; \$50,000. Assessment of acute response to: self-expanding non-degradable, low-profile percutaneous tricuspid valve; "template based", electrospun, biodegradable, tricuspid valve with chordae tendineae; electrospun, biodegradable, polyurethane, stentless, multi-leaflet tricuspid valve; on porcine model. Co-PI: A. D'Amore, Co-PI: W. Wagner, University of Pittsburgh;

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

Premi:

(11/2017) Finalist for the Franco Strazzabosco award for young engineers - ISSNAF (Italian Scientists and Scholars in North America Foundation), top 3 engineers < 40 years old in Italy, Washington DC.

Lezioni su invito:

(11/2017) "Heart valve structure, functional heterogeneity and mechanics". Mediterranean institute for transplantation and advanced specialized (ISMETT) Palermo, Italy;

(11/2017) "Bioinspired control of structure-function to design better performing tissue engineering heart valves". ETH, Zurich, Switzerland.

Conferenze

In Vivo Functional Assessment of a Novel Bioinspired Scaffold-Based Tissue Engineered Heart Valve, G. N. Cohan, MD, A. D'Amore, Y. Matsumura, D. Pederson, S. K. Luketich, B. Kandala, V. Shanov, T.E. David, W. R. Wagner, V. Badhwar. *American Association for Thoracic Surgery (AATS 2018) 2018 meeting*, Aprile 2018, New York, USA

Pubblicazioni

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.

Proprietà intellettuale

US provisional patent application 62/473,588 filed on 03/2017, topic: biomedical device, title: "Mandrel-less Electrospinning Processing Method and System, and Uses Therefor". Lead innovator/developer: A D'Amore;

US provisional patent application 62/458,234 filed on 02/2017, topic: biomedical device, title: "Expandable percutaneous cannula". Lead innovator/developer: A D'Amore;

US provisional patent application 62/462,628 filed on 02/2017, topic: biomedical device, title: "A stentless biopolymer heart valve replacement capable of living tissue regeneration". Lead innovator/developer: A D'Amore;

US patent application PCT/US2017/014341 with WO (International publication number WO 2017/127682 A1) published on 08/2017, topic: biomedical device and surgical method, title: "Trans-atrial access for intracardiac therapy".

Obiettivi per il 2018

Completare attuali studi pre-clinici con seguenti obiettivi primari:

- Prove di cinematica e funzione su modello acuto (e.g. < rigurgito moderato, buona mobilità delle cuspidi);
- caratterizzare e riprodurre la meccanica fisiologica delle valvole cardiache native umane;
- verificare crescita tessutale endogena/resistenza alla calcificazione/bassa trombogenicità;
- esplorare strategie di intervento percutaneo transcateretere per la valvola tricuspide.

Area Terapeutica: **MALATTIE CARDIOVASCOLARI**

Parete di miocardio ingegnerizzata (TECP)

Antonio D'Amore, Ph.D.

adamore@fondazionerimed.com

Breve descrizione

TECP. sviluppare dispositivi di confinamento e supporto della funzione cardiaca per pazienti affetti da infarto del miocardio.

Impatto

Introduzione di strategie e tecnologie innovative per mitigare il rimodellamento maladattativo indotto dall'infarto del miocardio.

Risultati raggiunti nel 2017

Risultati scientifici:

Completato studio *in vivo* su ratto, valutato patch cardiaco a doppio strato, risultati principali: riduzione assottigliamento parete, angiogenesi, riduzione tessuto fibrotico, mantenimento funzione ventricolare a 10 settimane dall'infarto, *M1-M2 switch*. Completata valutazione *in vivo* su modello di difetto parete addominale di *scaffold* per rilascio controllato farmaco, progetto in collaborazione con Dr Fazzari e Dr Freeman, risultati principali: incremento di angiogenesi, riduzione tessuto fibrotico. Dimostrato *in vivo* principio di trapianto autologo di flap muscolare ottenuto da patch multi strato, progetto finanziato da AFIRM- DoD.

Finanziamenti ottenuti - collaborazioni attive:

Armed Forces Institute of Regenerative Medicine, AFIRMII, W81-XWH-13-2-XXXX, \$900,000 for 1/2014 - 12/2017. *Creating innervated vascularized muscle flaps from elastic, cellularized bio-composites developed in situ for facial muscle reconstruction*. PI: W. Wagner, Project leader: A. D'Amore, University of Pittsburgh;

NIH 5R01 AR054940-0. *Cellular remodeling of ECM scaffolds*. PI: S. Badylak, University of Pittsburgh. Role: A. D'Amore collaborator, ECM-polymeric scaffolds for cardiac patch design and fabrication;

Attività didattica:

(11/2015-11/2017) 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.

Conferenze

Design of Thermoresponsive Hydrogels and Biodegradable, Thermoplastic Elastomers for Interventions in Cardiac Wall Remodeling Following Myocardial Infarction, Y. Zhu, X Gu, A. D'Amore, Y Matsushima, W. Wagner. *Society for Biomaterials Conference (SFB)*, Aprile 2017, Minneapolis, USA

Lectio magistralis:

Reducing the injury from myocardial infarction: engineered biohybrid cardiac patch. McGowan Institute for Regenerative Medicine scientific retreat. Cardiovascular session, Marzo 2017, Nemaquin, USA.

Pubblicazioni

Fazzari, H. Jiang, S. K. Luketich, M. E. Luketich, R. F. Hoff, D. L. Jacobs, X. Gu, S. F. Badylak, B. A. Freeman, W.R. Wagner. Nitro-oleic acid (NO₂-OA) release enhances regional angiogenesis in a rat abdominal wall defect model. Accepted on *Tissue Engineering Part A*, IF 3.58. McGowan Institute for Regenerative Medicine' paper and picture of the month (12-2017).

Chen, Y. Zhu, S. Ye, S. K. Luketich, A. D'Amore, W. Wagner. Hybrid scaffolds of Mg alloy mesh reinforced polymer/extracellular matrix composite for critical-sized calvarial defect reconstruction. Submitted to *Journal of Tissue Engineering and Regenerative Medicine*, IF 4.71."

Proprietà intellettuale

US patent application PCT/US2017/051005 with WO, (International publication number WO 2016/044787 A1) published on 03/2017, topic: biomedical device, title: "Bi-layer polyurethane - extracellular matrix scaffolds for improved ischemic ventricular wall remodeling". Lead innovator/developer: A D'Amore;

US provisional patent application 62/588,830, filed on 11/2017, topic: controlled release system/drug for angiogenesis, title: "Nitro-oleic acid (NO₂-OA) controlled release platform to induce regional angiogenesis in abdominal wall repair". *Lead innovator/developer: A D'Amore.*

Obiettivi per il 2018

- Sviluppo di scaffold per patch cardiaco con obiettivi primari.
 - Mantenimento delle funzioni ventricolari
 - Crescita tessutale endogena/riduzione di tessuto fibrotico
 - 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 elasticita' degli scaffold utilizzati per il patching del miocardio, progetto in collaborazione con il Dr Soares e il Dr Sacks.
- Esplorare tecniche di impianto minimamente invasivo del patch cardiaco, progetto in collaborazione con il Dr Pilato, Dr Morsolini, Dr Raffa (ISMETT).
- Effetti, metodi e potenziali del patching di ventricolo destro, progetto in collaborazione con il Dr Coyan, Dr Silveira-Filho e Dr Sciortino.

Area Terapeutica: **MALATTIE CARDIOVASCOLARI**

Vasi sanguigni ingegnerizzati (TEVG)

Antonio D'Amore, Ph.D.

adamore@fondazionerimed.com

Breve descrizione

TEVG: sviluppare vasi sanguigni ingegnerizzati da impiegare come protesi vascolare nel bypass coronarico.

Impatto

Introduzione di strategie e tecnologie innovative per bypass coronarico e per il trattamento dell'ischemia arti inferiori.

Risultati raggiunti

Risultati scientifici

Completato studio *in vivo* su ratto, valutata efficacia di *vascular graft* a doppio strato e *seeding* rapido "same day". Perfezionata tecnica di fabbricazione e realizzato prototipi per 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 *scaffold* per R21 e R01 in collaborazione con il Dr Vorp.

Collaborazioni attive finanziate

NIH (NIBIB) 1R21EB016138, Autologous stem cell-based tissue engineered vascular grafts. PI: D. Vorp. University of Pittsburgh. Role: A. D'Amore collaborator, vascular graft fabrication;

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.

Seminari-lezioni

(02/2016-02/2017) Guest lecturer for the biomedical engineering master of science program, BIO-ENG 2810. Department of bioengineering, University of Pittsburgh. Title: "A brief overview on polymers processing methods for soft tissue engineering".

Conferenze

Assessment of Human Stem Cell Retention and Host Cell Invasion in an Implanted Seeded Tubular Scaffold, Snyder, K. Lorentz, D. Haskett, K. Saleh, A. D'Amore, W. R. Wagner, J. Weinbaum, D. Vorp. *Biomedical engineering society, annual meeting (BMES 2017)*, Ottobre 2017 Phoenix, USA.

Feasibility of a "same day" autologous tissue-engineered vascular graft remodeling in a seeded elastomeric scaffold, D. G Haskett, K.I 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. *Summer Biomechanics, Bioengineering and Biotransport Conference*. Giugno 2017, Tucson, USA.



Publicazioni

J. T. Krawiec, H.T. Liao, L. Y. Kwan, A. D'Amore, J. S.Weinbaum, J. P.Rubin, W. R.Wagner, D. A. Vorp. Evaluation of the Stromal Vascular Fraction of Adipose Tissue as the Basis for a Stem Cell-Based Tissue Engineered Vascular Graft. *Journal of Vascular Surgery* 2017, 66 (3), 833-890, IF 3.77.

Proprietà intellettuale

US provisional patent application 62/537,143, filed on 07/2017, topic: biomedical device, title: "Multi-Layered Graft for Tissue Engineering Applications". *Lead innovator/developer*: A. D'Amore.

Obiettivi

Sviluppo di vasi ingegnerizzati innovativi con i seguenti obiettivi principali:

- riprodurre la meccanica fisiologica di arterie e vene;
- crescita tessutale endogena/funzionalità del vaso/bassa trombogenicità;
- riduzione della iperplasia intimale.

Caratterizzare biomeccanica delle coronarie umane;

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.

Area Terapeutica: **MALATTIE CARDIOVASCOLARI**

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

Antonio D'Amore, Ph.D.

adamore@fondazionerimed.com

Breve descrizione

NET-IBA: sviluppo di algoritmi e metodi automatici per l'analisi strutturale e morfologica di tessuti nativi e *scaffolds*.

Impatto

Metodi innovativi di istologia quantitativa.

Metodi innovativi di analisi morfologica di materiali micro e nano-strutturati.

Risultati raggiunti nel 2017

Risultati scientifici:

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.

Avviata collaborazione industriale con start-up company PECA Lab. Tema: caratterizzazione strutturale di medical device classe III FDA.

- Attività di consulenza nello sviluppo di valvola cardiaca pediatrica in ePTFE.

Validato *software* per l'individuazione automatica di vasi sanguigni su sezioni istologiche.

- Collaborazione attiva con il Dr Bruno, Dr Ardizzone e Dr Pirrone Univ. Palermo.

Validato *software* per la caratterizzazione strutturale di componenti in ePTFE.

Finanziamenti ottenuti - collaborazioni attive:

(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.

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

Premi\riconoscimenti:

(03/2017) Italian national board qualification for associate professor in biomedical engineering (Abilitazione Scientifica Nazionale di seconda fascia, settore scientifico disciplinare: bioingegneria industriale ING/IND 34). Core dell'attività di ricerca in seno alla linea NET-IBA.

(12-2017) Nitro-oleic acid (NO₂-OA) release enhances regional angiogenesis in a rat abdominal wall defect model. Accepted on Tissue Engineering Part A, *IF 3.58*. McGowan Institute for Regenerative Medicine' paper and picture of the month (12-2017).

Conferenze

Analysis of Expanded Polytetrafluoroethylene (ePTFE) Membranes for Use Within a Valved Conduit for Right Ventricular Outflow Tract Reconstruction, Loneker, A. Kalra, S. Luketich, D. Bernstein, A. D'Amore, D. Faulk. *Biomedical engineering society, annual meeting (BMES 2017)*, Ottobre 2017, Phoenix, USA

Preclinical Development of a Radially Expandable Vascular Conduit for Pediatric Cardiovascular Surgery, Loneker, A. Kalra, A. Nugent, S. Luketich, D. Bernstein, A. D'Amore, D. Faulk, *Biomedical engineering society, annual meeting (BMES 2017)*, Ottobre 2017, Phoenix, USA

Mechanical and Microstructural Analysis of an Expandable Vascular Conduit for Pediatric Cardiovascular Surgery, Loneker, S. Luketich, D. Bernstein, A. Kalra, A. D'Amore, D. Faulk. *Society for Biomaterials Conference (SFB)* Aprile 2017, Minneapolis, USA

Pubblicazioni

Loneker, S. K. Luketich, D. Bernstein, A. Kalra, A. Dees, A. D'Amore, D. M. Faulk. Mechanical and Microstructural Analysis of a Radially Expandable Vascular Conduit for Neonatal and Pediatric Cardiovascular Surgery. In press on *Journal of Biomedical Materials Research Part A*, *IF 3.26*.

A. D'Amore, M. Fazzari, H. Jiang, S. K. Luketich, M. E. Luketich, R. F. Hoff, D. L. Jacobs, X. Gu, S. F. Badylak, B. A. Freeman, W.R. Wagner. Nitro-oleic acid (NO₂-OA) release enhances regional angiogenesis in a rat abdominal wall defect model. Accepted on Tissue Engineering Part A, *IF 3.58*. McGowan Institute for Regenerative Medicine' paper and picture of the month (12-2017).

Obiettivi per il 2018

Estensione 3D dei metodi di analisi 2D sviluppati per materiali micro e nano strutturati. La corrente versione del software di analisi sviluppato "Gordium" prevede l'impiego di dati 2D da microscopia elettronica, la ricerca pianificata per il 2018-2019 prevede l'estensione di questo metodo su 3D e sulla base di dati da microscopia confocale.

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

Area Terapeutica: **MALATTIE CARDIOVASCOLARI**

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

Antonio D'Amore, Ph.D.

adamore@fondazionerimed.com

Breve descrizione

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

Impatto

- Creazione di strumenti per assistere la progettazione di tessuti ingegnerizzati e biomateriali.
- Creazione di strumenti per comprendere l'interazione tra meccanica multi-scala, sintesi de-dovo di ECM e degradazione del materiale.
- Creazione di strumenti e metodi per comprendere la relazione tra macro - meso e - micro scala in tessuti nativi i ingegnerizzati, applicazioni: TEHV, TEVG, TECP.

Risultati raggiunti nel 2017

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).

Capacità di riprodurre topologia di materiali a natura fibrosa.

Attività didattica:

(06/2016-06/2017) Guest lecturer, lecture on processing methods for polymeric biodegradable scaffolds, regenerative medicine summer school, endorsed by TERMIS and Society for Biomaterials, University of Pittsburgh, ~20 students;

Conferenze

Engineering micro-architecture to enhance de novo extracellular matrix elaboration in an elastomeric scaffold model. International symposium on Nanoengineering for Mechanobiology, Marzo 2017, Camogli, ITA

Pubblicazioni

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. The aged skeletal muscle extracellular matrix promotes muscle stem cell fibrogenic conversion. *Aging Cells* 2017 16 (3), 518-528, IF 6.34



A. D'Amore, J. Soares, J. Stella, W. Zhang, N. Amoroso, J. Mayer, W. Wagner, M. Sacks. Large strain stimulation enhances extracellular matrix production and stiffness in an elastomeric scaffold model. *Journal of the Mechanical Behavior of Biomedical Materials* 2016 (62), 619–635, 5Y-IF 3.15.

Obiettivi per il 2018

Supporto alla progettazione per linee di ricerca TEHV, TECP e TEVG;

Supporto alla modellazione *in vitro* prevista in BE-ECM.

Sviluppo (2018-2020) di modelli predittivi di crescita tessutale 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 (NO₂-OA) release enhances regional angiogenesis in a rat abdominal wall defect model. Accepted on *Tissue Engineering Part A*, IF 3.58.

Sviluppo (2018-2020) modelli di simulazione degradazione di scaffold *in vivo*.

Sviluppo (2018-2020) modelli di simulazione di migrazione cellulare al variare della topologia del biomateriale.

Area Terapeutica: **MALATTIE CARDIOVASCOLARI**

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

Antonio D'Amore, Ph.D.

adamore@fondazionerimed.com

Breve descrizione

Modelli elastomerici *in vitro* per lo studio della meccanobiologia dei tessuti molli.

Impatto

- Capacità di simulare crescita endogena su *scaffold* ingegnerizzati sottoposti a carico meccanico.
- Capacità di simulare degradazione *in vivo* di *scaffold* ingegnerizzati.
- Capacità di studiare impatto di segnali topologici e meccanici sull'elaborazione di ECM.

Risultati raggiunti nel 2017

La piattaforma *in silico* sviluppata a partire dal 2009 dal PI ed i suoi collaboratori prevede l'impiego di scaffold polimerici di natura fibrosa in grado di sostenere larghe deformazioni combinati con cellule. In particolare, la linea di ricerca progettata a supporto dello sviluppo di valvole cardiache ingegnerizzate (TEHV), vasi sanguigni ingegnerizzati (TEVG) e patch cardiaco (TECP), utilizza bioreattori a carico uniassiale e poliuretani degradabili (e.g. PEUU, PCUU, PECUU) micro-integrati con cellule via *electro-spray*. L'obiettivo è quello di rispondere a domande fondamentali riguardanti i meccanismi di trasduzione di carico *in vivo* utilizzando sistemi semplificati di sintesi di matrice extracellulare *in silico*. Permutazioni di questo concetto hanno concesso di:

- individuare un nuovo meccanismo per incrementare la formazione di ECM a parità di carico meccanico di macro scala, principio applicabile a: TECP e TEVG;
 - i carichi meccanici ai quali sono soggetti i tessuti biologici sono imposti dalla fisiologia, l'ipotesi di ricerca consisteva nel verificare che a parità di carico meccanico di macro scala la struttura del tessuto artificiale può essere calibrata per incrementare la crescita di tessuto endogeno. La variabile strutturale di meso scala studiata è stata la densità di intersezione delle fibre.
- implementare apparato di condizionamento meccanico di corde tendinee;
 - nuova IP sviluppata dal PI e collaboratori ha consentito la fabbricazione di corde tendinee micro-strutturate, queste in aggiunta a complementare lo sviluppo di valvole atrioventricolari ingegnerizzate (mitrale e tricuspide, linea TEHV) rappresentano un modello ideale per studiare la sintesi di ECM da fibroblasti integrati su matrici polimeriche altamente allineate.
- implementare apparato per indurre degradazione accelerata di valvole cardiache polimeriche;
 - i tessuti ingegnerizzati prevedono la sostituzione graduale dello scaffold con tessuto endogeno, autologo e funzionale. Questo richiede la calibrazione delle curve di degradazione del materiale che a sua volta richiede complesse e costose misurazioni *in vivo*. I sistemi *in silico* sviluppati



hanno come obiettivo quello di simulare con quanto più realismo possibile le condizioni di degradazione riducendo tempi, costi e numero di cavie animale utilizzate nella sperimentazione pre-clinica.

Conferenze

Engineering micro-architecture to enhance de novo extracellular matrix elaboration in an elastomeric scaffold model. Keynote speech at *International symposium on Nanoengineering for Mechano-biology*, Marzo 2017, Camogli, ITA.

Pubblicazioni

Articolo in preparazione, esperimenti conclusi, primo autore da sottoporre sulla rivista *Soft Matter*.

Obiettivi per il 2018

Perfezionare e promuovere la piattaforma sperimentale BE-ECM, in particolare:

- sottoporre articolo come primo autore su tema meccanobiologia e topological cues, rivista *Target Soft Matter*;
- individuare regime di condizionamento per corde tendinee artificiali in grado di riprodurre massa e proprietà meccaniche delle corde tendinee native;
- valutare curve di degradazione delle valvole atrioventricolari ingegnerizzate sviluppate nella linea di ricerca TEHV.

Area Terapeutica: **MALATTIE CARDIOVASCOLARI**

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

Salvatore Pasta, Ph.D

spasta@fondazionerimed.com

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 2017

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 aortica e patologie cardiache quali lo scompenso cardiaco dovuto a ipertensione polmonare o causato dai dispositivi di assistenza ventricolare come soluzione ponte per il trapianto di cuore. Abbiamo anche studiato le complicanze indotte da applicazioni *off-label* di endoprotesi per il trattamento di traumi dell'aorta. I risultati sono validati da studi sperimentali *in vitro*.

Conferenze

A novel multiwavelength procedure for blood pressure estimation using PPG sensor at peripheral artery and capillaries, Scardulla F, D'Acquisto L, Barrett L, Pasta S, Hu S. *10th International Symposium on Mobile Mapping for Sustainable Development*, Gennaio 2017, Modena, ITA

Predicting Right Heart Failure in Patients with Pulmonary Hypertension, Scardulla F, Bellavia D, Vitulo P, Romano G, Minà C, Gentile G, et al. *Annual Cardiovascular Magnetic Resonance conference (EuroCMR 2017)*, Maggio 2017, Prague, CZE.



Pubblicazioni

Scardulla F., Pasta S., D'Acquisto L., Sciacca S., Agnese V., Vergara C., et al. Shear stress alterations in the celiac trunk of patients with a continuous-flow left ventricular assist device as shown by in-silico and in-vitro flow analyses. *The Journal of heart and lung transplantation: the official publication of the International Society for Heart Transplantation*. 2017.

Scardulla F., Bellavia D., Vitulo P., Romano G., Mina C., Gentile G., et al. Biomechanical Determinants of Right Ventricular Failure in Pulmonary Hypertension. *ASAIO journal*. 2017.

Scardulla F., Bellavia D., D'Acquisto L., Raffa GM, Pasta S. Particle image velocimetry study of the celiac trunk hemodynamic induced by continuous-flow left ventricular assist device. *Medical engineering & physics*. 2017; 47:47-54.

Pasta S., Zingales M. Special Issue on "Frontier Biomechanical Challenges in Cardiovascular Physiopathology". *Medical engineering & physics*. 2017; 47:1.

Pasta S., Gentile G., Raffa G.M., Scardulla F., Bellavia D., Luca A., et al. Three-dimensional parametric modeling of bicuspid aortopathy and comparison with computational flow predictions. *Artificial organs*. 2017

Pasta S, Gentile G, Raffa GM, Bellavia D, Chiarello G, Liotta R, et al. *In Silico* Shear and Intramural Stresses are Linked to Aortic Valve Morphology in Dilated Ascending Aorta. *European journal of vascular and endovascular surgery: the official journal of the European Society for Vascular Surgery*. 2017

Pasta S, Agnese V, Di Giuseppe M, Gentile G, Raffa GM, Bellavia D, et al. *In Vivo* Strain Analysis of Dilated Ascending Thoracic Aorta by ECG-Gated CT Angiographic Imaging. *Annals of biomedical engineering*. 2017

Malvindi PG, Pasta S, Raffa GM, Livesey S. Computational fluid dynamics of the ascending aorta before the onset of type A aortic dissection. *European journal of cardio-thoracic surgery: official journal of the European Association for Cardio-thoracic Surgery*. 2017; 51:597-9.

Proprietà intellettuale

UA2017A003931, 31/05/2017, Metodo e sistema per la valutazione del rischio di un aneurisma dell'aorta toracica ascendente

Obiettivi per il 2018

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.

Area Terapeutica: **MALATTIE INFIAMMATORIE**

Un sistema di coltura organotipica 3D microfisiologico per studiare il degrado e la rigenerazione di tessuti scheletrici composti in microgravità

Riccardo Gottardi, Ph.D.

rgottardi@fondazionerimed.com

Leading Partner

University of Pittsburgh, USA

Breve descrizione

In questo progetto stiamo adattando il nostro bioreattore, da utilizzare sulla Stazione Spaziale Internazionale, per studiare gli effetti dei bifosfonati sulla cartilagine e sull'osso quando somministrati per contrastare la perdita ossea indotta dalla microgravità.

Impatto

La Stazione Spaziale Internazionale offre l'opportunità unica di osservare l'invecchiamento accelerato, offrendo un modello unico e prezioso di perdita di volume osseo simile all'osteoporosi. Comprendere gli effetti dei bisfosfonati avrà effetti diretti per la salute sulla Terra, dove i bifosfonati sono utilizzati clinicamente per contrastare l'osteoporosi. Inoltre, questo lavoro servirà da ulteriore convalida del nostro bioreattore al fine di favorirne la commercializzazione.

Risultati raggiunti nel 2017

Stiamo sviluppando il modello osseo *in vitro* includendo osteoclasti e osteoblasti. Il modello di cartilagine basato sulla gelatina metacrilata è completo. Il design del bioreattore è stato migliorato per il funzionamento sulla SSI. Un primo modello del sistema fluidico e di controllo è stato realizzato ed è ora in via di miglioramento.

Conferenze

Application of 3D Microtissue Chip Technology to Study Composite Skeletal Tissue Physiology: Microgravity-Induced Pathologies and Drug Screening, R.S. Tuan. Symposium Speaker 33rd Annual Meeting, American Society for Gravitational and Space Research, Ottobre 2017, Seattle, USA

A Microphysiological 3D Organotypic Culture System for Studying Degradation and Repair of Composite Skeletal Tissues in Microgravity, R. Gottardi, P.G. Alexander, P. Simson, V. Rotolo, C. Britt, J.P. Wiksw, R.S. Tuan. *International Space Station Research&Development Conference 2017*, Luglio 2017, Washington DC, USA

An Osteochondral Microphysiological System To Study Cartilage-Bone Interaction In Native Tissues And Engineered Model Constructs, R. Gottardi, A. Piroso, G. Conoscenti, H. Lin, G. D'Urso, L. Iannetti, P. Zunino, T.P. Lozito, P.G. Alexander, V. La Carrubba, V. Brucato, R.S. Tuan. *Fusion Conference on Musculoskeletal Development and Regeneration*, Febbraio 2017, Cancun, MEX



Pubblicazioni

E. Bayer, J. Jordan, A. Roy, R. Gottardi, M.V. Fedorchak, P. Kumta, S.R. Little. Programmed PD-GF-BB and BMP-2 Delivery from a Hybrid, Calcium Phosphate/ Alginate Scaffold. *Tissue Engineering*. 2017, 23(23-24): 1382-1393. Article featured on the Journal Cover.

Obiettivi per il 2018

Completare il modello osseo *in vitro*. Testare la risposta a un segnale infiammatorio e ai bifosfonati. Migliorare il sistema fluidico al fine di ridurre l'ingombro.

Area Terapeutica: **MALATTIE INFIAMMATORIE**

OACTIVE - Modelli computazionali avanzati personalizzati su più livelli per la prevenzione dell'Osteoartrite

Riccardo Gottardi, Ph.D.

rgottardi@fondazionerimed.com

Breve descrizione

L'osteoartrite (OA) è una malattia degenerativa della cartilagine articolare ed è la forma più comune di artrite. Sebbene la popolazione tipica associata alla condizione sia quella degli anziani, che sono per lo più inattivi, anche gli atleti e le persone più giovani ne sono soggette. Nonostante i dati disponibili abbiano mostrato il ruolo dei vari fattori di rischio modificabili o non modificabili, nessuno studio ha esplorato in modo conclusivo l'interazione e l'integrazione di altri set di informazioni in modo specifico per il paziente. OACTIVE intende compiere un significativo balzo in avanti adottando un approccio olistico multi-scala in cui le informazioni specifiche del paziente provenienti da vari livelli, tra cui cellule, tessuti, organi e l'intero corpo saranno integrate con informazioni provenienti da altre fonti come biomarcatori/biomarcatori infiammatori, modellistica comportamentale e fattori di rischio socio-ambientali al fine di generare validi predittori di nuovi interventi personalizzati per ritardare l'insorgenza e rallentare la progressione dell'OA. OACTIVE utilizzerà una combinazione di modelli computazionali meccanicistici, fenomenologici, simulazioni e analisi dei big data per simulare e predisporre i migliori trattamenti per la salute/gli esiti del paziente. Inoltre, gli interventi potenziati della Realtà Aumentata saranno sviluppati in un quadro personalizzato che consente ai pazienti di ricevere il trattamento in una forma più piacevole, con conseguente aumento della motivazione, del coinvolgimento e rispetto del trattamento stesso.

Impatto

La missione di OACTIVE è quella di migliorare l'assistenza sanitaria trasformando e accelerando la diagnosi e la previsione dell'OA sulla base di una comprensione più completa della fisiopatologia della malattia, delle dinamiche e degli esiti dei pazienti.

Risultati raggiunti nel 2017

Il progetto era affidabile e il finanziamento è stato ottenuto. La Fondazione Ri.MED è stata registrata presso la Commissione Europea come istituzione riconosciuta per le future proposte di progetto. L'incontro di avvio del progetto si è svolto a Novembre 2017.

Obiettivi per il 2018

Implementare gli obiettivi del progetto per l'anno uno. In particolare, eseguire lo *screening* di base delle unità osteocondali OA e sviluppare modelli *in vitro* di OA indotta. Identificare il personale di progetto necessario.

Area Terapeutica: **MALATTIE INFIAMMATORIE**

Sviluppo di bioreattori osteocondrali e di *scaffold* per lo studio degli effetti degli ormoni sessuali sulle patologie articolari e per la rigenerazione tissutale.

Riccardo Gottardi, Ph.D.

rgottardi@fondazionerimed.com

Breve descrizione

Stiamo studiando l'effetto protettivo degli ormoni sessuali sulla cartilagine e l'osso per il *cross-talk* osteocondrale. Stiamo sviluppando nuovi bioreattori microfisiologici per schermare gli effetti e sviluppare terapie. Inoltre, con l'obiettivo generale di riparare i tessuti muscoloscheletrici, stiamo sviluppando *scaffold* ed estratti di matrice extracellulare per aiutare a trattare il danno tissutale.

Impatto

Il nostro approccio si focalizza sullo sviluppo di nuove terapie per la rigenerazione di tessuti muscoloscheletrici, la principale causa di disabilità in Europa e negli U.S. Lo studio degli ormoni sessuali servirà a capire il loro ruolo in osteoporosi e osteoartrosi, e a sviluppare terapie ormonali sostitutive nuove e più pro-rigenerative, come altresì ad identificare nuovi target per il trattamento di queste patologie. Per la rigenerazione muscoloscheletrica, stiamo esplorando il ruolo degli estratti di matrice extracellulare per indirizzare cellule staminali verso uno specifico fenotipo.

Risultati raggiunti nel 2017

Quattro pubblicazioni. Sviluppo e validazione di estratti di legamento crociato anteriore e posteriore e bozza di manoscritto. Validazione su tessuto suino del bioreattore v1.7. Validazione con cellule fluorescenti del bioreattore v2.0. Risposta della cartilagine ad un segnale infiammatorio in presenza di estrogeno.

Conferenze

A 3D Printed Microfluidic Bioreactor to Engineering Biphasic Construct, G. De Riccardis, P.G. Alexander, M.T. Raimondi, R.S. Tuan, R. Gottardi. *Tissue Engineering and Regenerative Medicine International Society – Americas Annual Meeting*, Dicembre 2017, Charlotte, USA.

A 3D Printed Microfluidic Bioreactor to Engineering Biphasic Construct: Modelling and Experimental Validation, G. De Riccardis, P.G. Alexander, M.T. Raimondi, R.S. Tuan, R. Gottardi. *Biomedical Engineering Society Annual Meeting*, Ottobre 2017, Phoenix, USA.

An In Vitro Chondro-Osteo-Vascular Triphasic Model of the Osteochondral Complex, A. Piroso, R. Gottardi P.G. Alexander, D. Puppi, F. Chiellini, R.S. Tuan. *Biomedical Engineering Society Annual Meeting*, Ottobre 2017, Phoenix, USA.

Validation of an Osteochondral Bioreactor for In Vitro Drug Screening, K. Overholt, A. Piroso, R.S. Tuan, R. Gottardi. *Biomedical Engineering Society Annual Meeting*, Ottobre 2017, Phoenix, USA.

Validation of an osteochondral bioreactor applied to study the protective role of sex hormones, R. Gottardi, H. Lin, L. Iannetti, G. D'Urso, P. Zunino, T.P. Lozito, P.G. Alexander, P. Manner, R.S. Tuan. *Tissue Engineering and Regenerative Medicine International Society – EU Annual Meeting*, Giugno 2017, Davos, CH.

An in vitro chondro-osteo-vascular triphasic model of the osteochondral complex, R. Gottardi, A. Piroso, P.G. Alexander, D. Puppi, F. Chiellini, R.S. Tuan. *Tissue Engineering and Regenerative Medicine International Society – EU Annual Meeting*, Giugno 2017, Davos, CH.

A continuous pore size gradient PLLA scaffold for osteochondral regeneration, R. Gottardi, G. Conoscenti, P.G. Alexander, V. La Carrubba, V. Brucato, R.S. Tuan. *Tissue Engineering and Regenerative Medicine International Society – EU Annual Meeting*, Giugno 2017, Davos, CH.

H. Sasaki, B.B. Rothrauff, P.G. Alexander, R. Gottardi, H. Lin, F.H. Fu, R.S. Tuan. *In Vitro Repair of Meniscus Radial Tear Using Hydrogels Seeded With Adipose-Derived Stem Cells And TGF- β 3*. 11th Biennial International Society of Arthroscopy, Knee Surgery and Orthopaedic Sports Medicine Congress, June 2017, Shanghai, China.

Distributed and Lumped Parameter Models for The Characterization of High Throughput Bioreactors, L. Iannetti, G. D'Urso, G. Conoscenti, E. Cutrì, R.S. Tuan, M.T. Raimondi, R. Gottardi, P. Zunino. *5th International Conference on Computational and Mathematical Biomedical Engineering – CMBE2017*, Aprile 2017, Pittsburgh, USA.

Dual Fluidic High Throughput Bioreactor Obtained by 3D Printing, for Osteochondral and Other Biphasic Tissue Constructs Targeted at High Throughput Screening: Computational Model and Experimental Validation, R. Gottardi, G. D'Urso, L. Iannetti, G. Conoscenti, E. Cutrì, M.T. Raimondi, P. Zunino, R.S. Tuan. *Orthopaedic Research Society Annual Meeting*, Marzo 2017, San Diego, USA.

In Vitro Repair of Meniscus Radial Tear Using Hydrogels Seeded with Adipose-derived Stem Cells and TGF- β 3, H. Sasaki, B.B. Rothrauff, P.G. Alexander, H. Lin, R. Gottardi, F. Fu, R.S. Tuan. *Orthopaedic Research Society Annual Meeting*, Marzo 2017, San Diego, USA.

An Osteochondral Microphysiological System to Study Cartilage-Bone Interaction in Native Tissues and Engineered Model Constructs, R. Gottardi, A. Piroso, G. Conoscenti, H. Lin, G. D'Urso, L. Iannetti, P. Zunino, T.P. Lozito, P.G. Alexander, V. La Carrubba, V. Brucato, R.S. Tuan. *Fusion Conference Development and Regeneration*, Febbraio 2017, Cancun, MEX.

Pubblicazioni

M.L. Ratay, E. Bellotti, R. Gottardi, S.R. Little. *Modern Therapeutic Approaches for Ocular Diseases Involving Inflammation*. *Advanced Healthcare Materials*. 2017, 6(2):1700733. Article featured on the *Journal Cover*.

B.B. Rothrauff, L. Coluccino, R. Gottardi, L. Ceseracciu, S. Scaglione, L. Goldoni, R.S. Tuan. *Efficacy of thermoresponsive, photocrosslinkable hydrogels derived from decellularized tendon and cartilage extracellular matrix for cartilage tissue engineering*. *Journal of Tissue Engineering and Regenerative Medicine*. Accepted.



B.B. Rothrauff, K. Shimomura, R. Gottardi, P.G. Alexander, R.S. Tuan. Anatomical region-specific enhancement of 3-dimensional chondrogenic differentiation of human mesenchymal stem cells by soluble meniscus extracellular matrix. *Acta Biomaterialia*. 2017, 49:140-151

P.O. Numpaisal, B.B. Rothrauff, R. Gottardi, C.-L. Chien, R.S. Tuan. Rapidly dissociated autologous meniscus tissue to enhance meniscus healing: an *in vitro* study. *Connective Tissue Research*. 2017, 58(3-4):355-365

Obiettivi per il 2018

Completamento della validazione del nuovo micro-bioreattore realizzato con stampa 3D.

Area Terapeutica: **MALATTIE INFIAMMATORIE**

R-CaRE - Riabilitazione per la Rigenerazione Cartilaginea

Riccardo Gottardi, Ph.D.

rgottardi@fondazionerimed.com

Breve descrizione

Al momento vi è poca comprensione del ruolo della riabilitazione nel determinare la qualità del tessuto rigenerato dopo di un difetto cartilagineo riparato tramite microfrattura. Benché la maggior parte delle procedure chirurgiche siano efficaci nel breve termine, tra i 5 e 10 anni il trattamento riparativo fallisce nella quasi totalità dei casi. In questo progetto intendiamo applicare regimi riabilitativi quali simulati "continue passive motion" e "progressive weight bearing" in bioreattori specifici in un modello *in vitro* di microfrattura. Il nostro obiettivo è di identificare il meccanismo che mette in relazione regimi riabilitativi e rigenerazione del tessuto, differenziazione e integrazione.

Impatto

Questo approccio permette di sviluppare e testare *in vitro* sequenze di carichi che promuovono una migliore cartilagine rigenerata e che possano quindi essere riprodotti con protocolli riabilitativi *in vivo*. La presente domanda per il tema di Riabilitazione Rigenerativa affronta una mancanza nelle attuali conoscenze sulla rigenerazione cartilaginea, e una volta risolta quest'ultima potrebbe sia migliorare in modo estremamente significativo il nostro approccio alla salute, sia rivoluzionare il nostro approccio alla riabilitazione ortopedica.

Risultati raggiunti 2017

Il progetto è stato finanziato. Gli effetti di compressione (*simulated weight bearing*) e di test di taglio (*continuous passive motion*) sono stati studiati quando applicati indipendentemente uno dall'altro ad un modello di microfrattura. Questi dati preliminari serviranno ad una successiva richiesta di finanziamento all'NIH. È già stato redatto un manoscritto.

Conferenze

Engineered In Vitro Models for the Guidance of Rehabilitation Regimens that Promote Cartilage Regeneration after Repair Surgery, T. Iseki, S. Kihara, H. Sasaki, S. Yoshiya, F. Fu, R.S. Tuan, R. Gottardi. *Tissue Engineering and Regenerative Medicine International Society – Americas Annual Meeting*, Dicembre 2017, Charlotte, USA

In vitro models for the guidance of rehabilitation regimens that promote cartilage regeneration after repair surgery, T. Iseki, S. Kihara, H. Sasaki, S. Yoshiya, F. Fu, R.S. Tuan, R. Gottardi. *Biomedical Engineering Society Annual Meeting*, Ottobre 2017, Phoenix, USA



The Response of Bone Marrow Mesenchymal Stem Cells with Fibrin Gel Scaffolds Mimicking Microfracture to Mechanical Stress, T. Iseki, R. Gottardi, H. Sasaki, S. Kihara, S. Yoshiya, F. Fu, R.S. Tuan. *9th annual meeting of the Japanese Orthopaedic Society of Knee, Arthroscopy and Sports Medicine (JOSKAS)*, Giugno 2017, Sapporo, JPN

Proprietà intellettuale

Provisional Patent filed on 10/30/2017: Exemplary Multi-Well Plate Lids, Mechanical Stimulation Systems, and Incubators.

Obiettivi per il 2018

Studio dei meccanismi mechanobiologici connessi alla migliore performance della "simulated weight bearing".

Applicazione: **BIOMEDICALE E BIOTECNOLOGIE**

Sviluppo di bio-adesivi per ambienti acquosi

Caterina Alfano, Ph.D.

calfano@fondazionerimed.com

Breve descrizione

Studi effettuati su organismi marini sessili, quali le cozze, hanno evidenziato che questi organismi hanno sviluppato strategie per ancorarsi a superfici solide in ambienti acquosi le cui caratteristiche chimico-fisiche (quali pH e proprietà dielettriche) inibiscono generalmente processi di adesione. Tale caratteristica risulta notevolmente interessante nell'ambito della medicina rigenerativa e ingegneria dei tessuti, in cui è frequente la necessità di utilizzare prodotti adesivi in ambienti acquosi. Le cozze, ad esempio, sono in grado di ancorarsi fortemente a superfici rocciose in ambiente marino grazie alla secrezione di proteine "adesive" che in *Mytilus* sono indicate *mussel foot proteins* MFP-2, -3S, -3F, -4, -5 e -6. Negli ultimi anni enormi sforzi sono stati investiti nella creazione di adesivi bio-ispirati alle MFPs ma ad oggi non ne è derivato nessun prodotto efficace. Tutte le MFPs sono modificate post-traduzione con 3,4-dihydroxyphenyl-L-alanine (Dopa) e questa modifica è stata ritenuta per anni il fattore che più di altri conferisce proprietà adesive a questa classe di proteine.

Solo recentemente alcuni studi hanno evidenziato che a giocare un ruolo maggiore potrebbe essere la combinazione di interazioni redox e idrofobiche tra le varie MFPs, ma mancano ancora evidenze strutturali a supporto di tali ipotesi.

Il nostro progetto mira a colmare questa lacuna mediante la caratterizzazione strutturale e bio-fisica di proteine ricombinate da cozze asiatiche *Perna viridis*.

Impatto

Negli ultimi anni è nato un forte interesse della comunità scientifica per lo sviluppo di adesivi naturali per applicazioni in diverse aree cliniche quali, tra altri, l'ingegnerizzazione di tessuti, il trapianto di devices medicali e la chiusura di tagli e ferite. Esistono infatti casi in cui tecniche più classiche e consolidate, quali la sutura, non sono praticabili e in tali casi l'utilizzo di bio-adesivi diventa particolarmente importante. La grande sfida nello sviluppare nuove molecole bio-adesive è quella di trovare molecole in grado di funzionare in ambiente acquoso ed ostile. L'ingegnerizzazione di proteine bio-ispirate da organismi sessili, che naturalmente secernono proteine con proprietà adesive in ambienti marini, potrebbe essere la giusta strada per vincere questa sfida.

Risultati raggiunti nel 2017

Ingegnerizzazione di tre differenti proteine ricombinate da cozza *Perna viridis* con potenziali proprietà adesive.

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, accepted.

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.

Wang A.F., Deighan P., Chen S., Barrasso K., Garcia C., Martínez-Lumbreras S., Alfano C., Krysztofinska E.M., Thapaliya A., Camp A.H., Isaacson R.L., Hochschild A. and Losick R. (2017) A Novel RNA Polymerase-binding Protein that interacts with a Sigma-Factor Docking Site. *Molecular Microbiology*, 105(4):652-662.

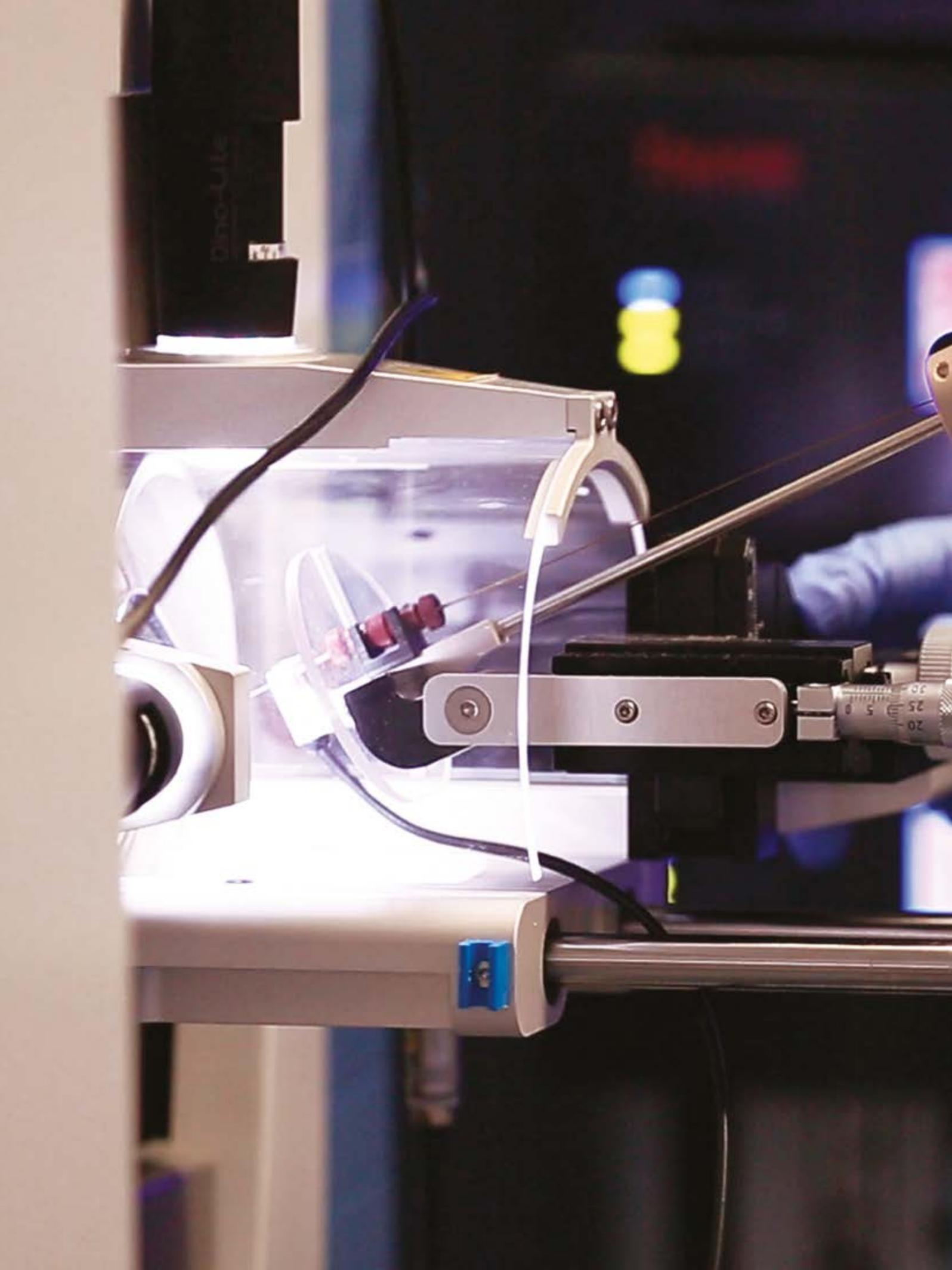
Alfano C., Sanfelice D., Martin S., Pastore A. and Temussi P. (2017) An optimized strategy to measure protein stability highlights differences between cold and hot unfolded states. *Nature Comm*, 8:15428.

Watts N., Zhuang X., Kaufman J., Palmer I., Dearborn A., Coscia S., Blech-Hermoni Y., Alfano C., Pastore A. Mankodi A. and Wingfield P. (2017) The Expression and Purification of ZASP Subdomains and Clinically Important Isoforms: High-affinity Binding to G-actin. *Biochemistry*, 56(14):2061-2070.

Bottega R., Nicchia E., Alfano C., Glembotsky A.C., Pastore A., Bertaggia-Calderara D., Bisig B., Duchosal M.A., Arbesú G., Alberio L., Heller P.G. and Savoia A. (2017) Gray platelet syndrome: Novel mutations of the NBEAL2 gene. *American Journal of Hematology* 92(2):E20-E22.

Obiettivi per il 2018

Caratterizzazione strutturale e biofisica delle tre proteine ricombinanti da cozza *Perna viridis*.





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.

Durante il 2017 sono state definite le piattaforme di chimica computazionale, bioinformatica, biofisica & biologia strutturale e di bioingegneria.

La piattaforma di chimica computazionale permette oggi di effettuare studi di dinamica molecolare per studiare le interazioni bimolecolari proteina-proteina e proteina-ligando, nonché di selezionare potenziali farmaci attraverso lo *screening in silico* di milioni di molecole sui bersagli terapeutici di interesse. E' stata implementata anche l'infrastruttura chemo-informatica per l'analisi strutturata delle proprietà chimico-fisiche, delle disponibilità commerciali etc. 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 delle proteine di interesse, nonché allo studio tridimensionale delle stesse proteine ed all'interazione proteina-molecola, proteina-peptide o proteina-proteina. Questa piattaforma 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. I modelli sviluppati dal team di bioingegneria vengono già oggi utilizzati nella stratificazione di pazienti a rischio clinico, nel supportare il sistema decisionale in aziende del settore, nello sviluppo preclinico di nuovi *device* biomedici.

Le piattaforme verranno ulteriormente potenziate durante il 2018 sia in termini di risorse umane che di strumentazioni.

PIATTAFORMA DI BIOINFORMATICA

Claudia Coronello, Ph.D.

ccoronello@fondazionerimed.com

Breve Descrizione

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*.

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*

Piattaforme Tecnologiche

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*. Per venire incontro alle esigenze dei collaboratori, siamo in procinto di dotarci dei più utilizzati software per l'analisi di dati *high-throughput*, quali *GeneSpring* e *Ingenuity Pathway Analysis*.

Hardware

3 workstations

Server: 80 CPUs e 2 x NVIDIA Tesla K80

Progetti di ricerca attivi

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

Rete di interazioni microRNA-mRNA

E' nostro obiettivo sviluppare algoritmi per modellizzare, visualizzare e confrontare le reti di intera-



zione 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

Coronnello C, Perconti G, Rubino P, Contino F, Bivona S, Feo S, Giallongo A. (2017) Detecting significant features in modeling microRNA-target interactions. *PeerJ Preprints* 5:e3337v1

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

PIATTAFORMA DI BIOINGEGNERIA

Gaetano Burriesci, Ph.D.

gburriesci@fondazionerimed.com

Breve Descrizione

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

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.

Piattaforme tecnologiche

L'unità di Bioingegneria opera all'interno dell'*Advanced Technologies Network Center (ATeN-Center, <http://www.atencenter.com/en/>)* e, al momento, sta mettendo in atto un profondo ampliamento della propria piattaforma tecnologica, equipaggiandola con le seguenti dotazioni:

Dotazioni computazionali

- Software di progettazione assistita da calcolatore (CAD);
- Codice di segmentazione avanzata di immagini medicali per generazione di modelli paziente-specifici;
- Codici per analisi agli elementi finiti lineari e non lineari, basati approcci impliciti ed espliciti;
- Codici per simulazioni termo-fluidodinamiche, multifisiche e di interazione fluido-strutturale;
- Server a 4 nodi e 72 core di processore.

Dotazioni sperimentali

- Simulatore cardiaco fluido-meccanico per la caratterizzazione idrodinamica di soluzioni terapeutiche, rispondente alle normative ISO 5840, ISO 5840-3, ISO-17845, ed FDA;
- Sistema di velocimetria ottica PIV;
- Sistema accelerato per la stima di vita utile delle protesi cardiovascolari;
- Macchina di prova materiali uniassiale per tessuti biologici e biomateriali, strumentata con bagno a temperature controllata e afferraggi pneumatici.
- Macchina di prova materiali biassiale per tessuti biologici e biomateriali, strumentata con bagno a temperature controllata.

Dotazioni di prototipazione

- Sistemi di stampa 3D per Modellazione a deposizione fusa e stereolitografia;
- Forni per il trattamento termico di biomateriali e la termoformatura di componenti in lega NiTi.

Progetti di ricerca attivi

- Previsione del rischio dello scompenso del ventricolo destro in pazienti con ipertensione polmonare e dispositivi di assistenza ventricolare (VAD).
- Valutazione non-invasiva dell'ipertensione portale in pazienti con cirrosi epatica.
- Sviluppo di un supporto decisionale per la stratificazione del rischio clinico dell'aneurisma aortico toracico ascendente.
- Sviluppo di una valvola aortica transcateretere innovativa.
- Sviluppo di una valvola cardiaca in tessuto animale priva di Alfa-Gal.
- Sviluppo di una valvola transcateretere mitrale innovativa.
- Analisi dell'appendice atriale sinistra per predire il rischio di trombosi.
- Predizione del potenziale di lesioni ischemiche a seguito di terapie cardio-valvolari.

Pubblicazioni

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).

Scardulla, F., Bellavia, D., Vitulo, P., Romano, G., Mina, C., Gentile, G., Clemenza, F., **Pasta, S.** (2017) Biomechanical Determinants of Right Ventricular Failure in Pulmonary Hypertension. *ASAIO Journal*, doi: 10.1097/MAT.0000000000000683.

Bozkurt, S., Preston-Maher, G.L., Torii, R., **Burriesci, G.** (2017) Design, Analysis and Testing of a Novel Mitral Valve for Transcatheter Implantation. *Annals of Biomedical Engineering* 45(8):1852-1864.

Pasta, S., Gentile, G., Raffa, G.M., Bellavia, D., Chiarello, G., Liotta, R., Luca, A., Scardulla, C., Pilato, M. (2017) In Silico Shear and Intramural Stresses are Linked to Aortic Valve Morphology in Dilated Ascending Aorta. *European journal of vascular and endovascular surgery*, 54(2):254-263.

Rahmani, B., Tzamtzis, S., Sheridan, R., Mullen, M.J., Yap, J., Seifalian, A.M.

Burriesci, G. (2017) In-Vitro Hydrodynamic Assessment of a New Transcatheter Heart Valve Concept (The TRISKELE). *Cardiovascular Translational Research*, 10(2):104-115.

Scardulla, F., **Pasta, S.**, D'Acquisto, L., Sciacca, S., Agnese, V., Vergara, C., Quarteroni, A., Clemenza, F., Bellavia, D., Pilato, M. (2017) Shear Stress Alterations in the Celiac Trunk of Patients with a Continuous-Flow Left Ventricular Assist Device as Shown by In-Silico And In-Vitro Flow Analyses. *Journal of Heart and Lung Transplantation*, 36(8):906-913.

Capelli, C., Corsini, C., Biscarini, D., Ruffini, F., Migliavacca, F., Kocher, A., Laufer, G., Taylor, A.M., Schievano, S., Andreas, M., **Burriesci, G.**, Rath, C. (2017) Pledget-armed sutures affect the hemodynamic performance of biologic aortic valve substitutes: a preliminary experimental and computational study. *Cardiovascular Engineering and Technology*, 8(1):17-29.

Scardulla F, Bellavia D, D'Acquisto L, Raffa GM, **Pasta, S.** Particle image velocimetry study of the celiac trunk hemodynamic induced by continuous-flow left ventricular assist device. *Medical engineering & physics*. 2017;47:47-54.

Pasta S, Zingales M. Special Issue on "Frontier Biomechanical Challenges in Cardiovascular Physiopathology". *Medical engineering & physics*. 2017;47:1.

Pasta S, Gentile G, Raffa GM, Scardulla F, Bellavia D, Luca A, et al. Three-dimensional parametric modeling of bicuspid aortopathy and comparison with computational flow predictions. *Artificial organs*. 2017.

Pasta S, Agnese V, Di Giuseppe M, Gentile G, Raffa GM, Bellavia D, et al. *In Vivo* Strain Analysis of Dilated Ascending Thoracic Aorta by ECG-Gated CT Angiographic Imaging. *Annals of biomedical engineering*. 2017.

Malvindi PG, **Pasta S**, Raffa GM, Livesey S. Computational fluid dynamics of the ascending aorta before the onset of type A aortic dissection. *European journal of cardio-thoracic surgery: official journal of the European Association for Cardio-thoracic Surgery*. 2017;51:597-9.

PIATTAFORMA DI BIOLOGIA STRUTTURALE E BIOFISICA

Caterina Alfano, Ph.D.
calfano@fondazionerimed.com

Breve Descrizione

Il gruppo di Biologia Strutturale e Biofisica mira a fornire un valore aggiunto ad una grande varietà di progetti biologici studiando le relazioni struttura/funzione in sistemi biologici, con particolare attenzione ai meccanismi molecolari legati a patologie che potrebbero portare all'identificazione di potenziali bersagli terapeutici. In particolare, i nostri studi mirano a fornire informazioni biofisiche e strutturali dei fenomeni biologici guidati dal ripiegamento, aggregazione e interazione di proteine con il fine ultimo di scoprire nuovi farmaci.

Il gruppo utilizza un approccio interdisciplinare che combina tecniche biofisiche all'avanguardia come la risonanza magnetica nucleare, la calorimetria, la risonanza plasmonica di superficie, la microscopia a forza atomica ad alta risoluzione e la cristallografia 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 delle macromolecole, dei loro complessi e delle interazioni in cui sono coinvolte guidandoci quindi nella comprensione di meccanismi molecolari chiave alla base di serie patologie e nell'identificazione di ligandi potenzialmente terapeutici.

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.
- Determinazione della struttura tridimensionale di macromolecole mediante NMR ed altre tecniche.
- 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.

Piattaforme tecnologiche

Il gruppo di Biologia Strutturale e Biofisica opera all'interno dell'*Advanced Technologies Network Center (ATeN-Center, <http://www.atencenter.com/en/>)* ed è in fase di ampliamento della piattaforma equipaggiandola con:

- 800 MHz NMR spectrometer with cryogenically-cooled probe for $^1\text{H}/^{13}\text{C}/^{15}\text{N}$ multiple-resonance experiments;
- Surface Plasmon Resonance spectrometer
- Isothermal Calorimetry
- Bio-Layer Interferometry technology;
- High throughput crystallization platform.

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*, accepted.

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.

Wang A.F., Deighan P., Chen S., Barrasso K., Garcia C., Martínez-Lumbreras S., **Alfano C.**, Krysztofinska E.M., Thapaliya A., Camp A.H., Isaacson R.L., Hochschild A. and Losick R. (2017) A Novel RNA Polymerase-binding Protein that interacts with a Sigma-Factor Docking Site. *Molecular Microbiology*, 105(4):652-662.

Alfano C., Sanfelice D., Martin S., Pastore A. and Temussi P. (2017) An optimized strategy to measure protein stability highlights differences between cold and hot unfolded states. *Nature Comm*, 8:15428.

Watts N., Zhuang X., Kaufman J., Palmer I., Dearborn A., Coscia S., Blech-Hermoni Y., **Alfano C.**, Pastore A., Mankodi A. and Wingfield P. (2017) The Expression and Purification of ZASP Subdomains and Clinically Important Isoforms: High-affinity Binding to G-actin. *Biochemistry*, 56(14):2061-2070.

Bottega R., Nicchia E., **Alfano C.**, Glembotsky A.C., Pastore A., Bertaggia-Calderara D., Bisig B., Duchosal M.A., Arbesú G., Alberio L., Heller P.G. and Savoia A. (2017) Gray platelet syndrome: Novel mutations of the NBEAL2 gene. *American Journal of Hematology* 92(2):E20-E22.

PIATTAFORMA DI COMPUTER AIDED DRUG DESIGN

Ugo Perricone, Ph.D.

uperricone@fondazionerimed.com

Breve Descrizione

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: creazione e convalida di 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). Un altro obiettivo importante del gruppo è l'uso di tecniche miste come le tecniche di *screening virtuale* dinamica molecolare al fine di approfondire le indagini sulle interazioni bi-molecolari e il modo in cui piccole molecole possono legarsi al loro target di riferimento. Recentemente il gruppo CADD si occupa dello studio delle interazioni *proteina-proteina* e delle interazioni *proteina-acidi nucleici*.

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 a partire da traiettorie di dinamica molecolare)
- Creazione e gestione di Database molecolari
- *Data mining* applicato alla chimica medicinale

Piattaforme tecnologiche

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

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

Capacità di calcolo

- Library optimisation ~ 3,000 molecole/min
- Virtual Screening HTVS ~ 2,500 molecole /min
- Virtual screening SP ~ 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 nelle seguenti aree terapeutiche:

Oftalmologia

Il progetto ha come finalità la ricerca di molecole attive nell'inibizione di CD14, proteina coinvolta nel processo infiammatorio alla base della patologia della degenerazione maculare correlata all'età (AMD).

Deliverable: Libreria di molecole selettivamente attive sul target di riferimento.

Malattie infiammatorie

L'inflammasoma NLRP3 è uno dei più importanti complessi proteici coinvolti nel processo infiammatorio implicato in diverse patologie. Il progetto ha come scopo principale quello della progettazione razionale di molecole che possano selettivamente legare la proteina NLRP3 inibendone l'attivazione.

Deliverable: Libreria di molecole selettivamente attive sul target di riferimento, modelli di omologia della proteina intera (non ancora risolta con raggi X o NMR, se non parzialmente).

Oncologia

La modulazione epigenetica dei tumori è uno dei meccanismi maggiormente studiati nella progettazione di chemioterapie. Presso la Fondazione RI.MED sono attualmente attivi due progetti di ricerca finalizzati alla ricerca di modulatori di due proteine (**SIRT1 e KDM4**) coinvolte nella regolazione epigenetica dei tumori.

Deliverable: Libreria di molecole selettivamente attive sul target di riferimento.

CDK1 ha dimostrato di essere uno dei principali attori nella progressione del tumore al seno. Le strategie utilizzate in questo progetto riguardano la progettazione razionale di molecole analoghi strutturali della nortopsentina, prodotto naturale di origine marina, per il targeting della proteina **CDK1**.

Deliverable: Libreria di molecole selettivamente attive sul target di riferimento.

Le cellule di cancro alla prostata "**Pten-Null**" sono uno dei tipi di cellule più studiate per questo tipo di cancro. In questo progetto ci concentriamo sulla ricerca di molecole selettive che prendono di mira le proteine più importanti coinvolte nella progressione del cancro.

Deliverable: Libreria di molecole selettivamente attive sui target di riferimento.

EPH-B4 è una proteina coinvolta nel processo di angiogenesi a livello tumorale con conseguente progressione del tumore e formazione di metastasi. L'analisi strutturale del target insieme allo studio di similarità strutturale con molecole note per essere attive sul target viene messo in campo per la ricerca di nuove entità molecolari che siano selettive per questo target.

Deliverable: Libreria di molecole selettivamente attive sui target di riferimento.

Il complesso **MUC1 / CIN85** è uno dei protagonisti più importanti nella formazione di metastasi nella patologia tumorale. L'uso di tecniche computazionali è impiegato in questo caso per valutare l'interazione

proteina-proteina (PPI) e per guidare la progettazione razionale dei modulatori PPI che possano inibire il riconoscimento tra i due partner proteici.

Deliverables: Libreria di molecole selettivamente attive sul target di riferimento, modelli di omologia delle due strutture proteiche (non ancora risolte con raggi X o NMR se non parzialmente).

Malattie neurodegenerative

L'interazione proteina-proteina **TOM20 / alfa-sinucleina** è stata recentemente scoperta essere cruciale per la modulazione dei processi alla base del morbo di Parkinson. Sfortunatamente, nessuna struttura 3D di queste proteine è effettivamente disponibile se non parzialmente. L'uso della modellistica molecolare consente la costruzione di modelli di omologia delle proteine e l'uso conseguente in modo dinamico. Pertanto, l'interazione tra i due partner viene valutata aprendo nuove conoscenze sul design molecolare dei nuovi modulatori.

Deliverables: Libreria di molecole selettivamente attive sul target di riferimento, modelli di omologia delle due strutture proteiche (non ancora risolte con raggi X o NMR se non parzialmente).

Il recettore CB1 è una delle proteine coinvolte nella modulazione dei disturbi epilettici, specialmente a livello mitocondriale. L'approccio CADD è utilizzato in questo caso per screening virtuali su librerie di piccole molecole al fine di scoprire modulatori che possono essere selettivi su CB1. Una delle sfide più importanti quando si mira al sistema endocannabinoide è infatti la selettività verso uno solo dei due recettori principali e in questo caso la chimica computazionale rappresenta senza dubbio un valido aiuto nella progettazione razionale.

Deliverables: Libreria di molecole selettivamente attive sul target di riferimento.

Pubblicazioni

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

Gorska-Ponikowska M., **Perricone U.**, Kuban-Jankowska A., Lo Bosco G., Barone G., 2-Methoxyestradiol Impacts on Amino Acids-mediated Metabolic Reprogramming in Osteosarcoma Cells by Interaction with NMDA Receptor *J Cell Physiol.* (2017) DOI: 10.1002/jcp.25888

Perricone U., Wieder M., Seidel T., Langer T., Padova A., Almerico A.M., Tutone M., A Molecular Dynamics - Shared Pharmacophore Approach to Boost Early Enrichment Virtual Screening. A Case Study On PPAR-Alpha *ChemMedChem.* (2017) DOI 10.1002/cmdc.201600526.

PIATTAFORMA DI PROTEOMICA

Anna Paola Carreca, Ph.D.
apcarreca@fondazionerimed.com

Breve descrizione

La sezione di Proteomica si sviluppa all'interno della Fondazione Ri.MED partendo dalla consapevolezza che l'enorme quantità di dati fornita dalla genomica negli ultimi anni, ha sì fornito la capacità di correlare i diversi livelli di espressione genica alle diverse patologie, ma tali informazioni risultano purtroppo "statiche" ed incapaci di definire i diversi processi biochimici che si svolgono all'interno di una cellula e che portano alle modifiche post-traduzionali (PTM) delle proteine espresse, con conseguente coinvolgimento fisio-patologico e/o la capacità di influenzare il microambiente cellulare. Partendo da questo presupposto, il team ha sviluppato tecniche e competenze per effettuare sia studi di proteomica sistematica, quindi finalizzata all'identificazione di tutte le proteine sintetizzate da una popolazione cellulare, che studi di proteomica differenziale finalizzata quindi all'analisi delle differenze di espressione sia qualitativa che quantitativa tra due o più popolazioni cellulari.

Strumento indispensabile per lo studio del proteoma è la Spettrometria di Massa associata a Cromatografia Liquida ad alta prestazione (LC-MS), una tecnica analitica usata per identificare prodotti incogniti, per determinazioni quantitative di composti noti nonché per chiarire le proprietà strutturali e chimiche delle molecole. La LC-MS si basa sulla separazione della miscela complessa di proteine e sulla successiva ionizzazione di una molecola e sulla sua successiva frammentazione in ioni di diverso rapporto massa/carica (m/z), resi accessibili tramite un diagramma, ovvero lo spettro di massa. Gli ioni e la loro intensità relativa vengono sottoposti ad una accurata analisi bioinformatica mediante l'utilizzo di software dedicati e analisi dei più aggiornati database permettendo così di stabilire peso molecolare e struttura del composto in esame.

Competenze

- Concentrazione proteica da mezzi condizionati
- Quantizzazione Spettrofotometrica (Bradford, BCA, micro BCA):
- Precipitazione e processamento chimico del campione
- Proteolisi da gel e in soluzione
- *CleanUp* del digerito proteico
- Frazionamento per pH
- Arricchimento fosfopetidico per lo studio di modifiche post traduzionali (PTM)
- Marcatura metabolica SILAC (e relative colture cellulari)
- Marcatura isotopica TMT
- Proteomica quantitativa *Label free*
- *Western Blot*
- *SDS-PAGE*
- Analisi quantitativa e qualitativa di proteine predette e/o annotate tramite *liquid chromatography tandem mass spectrometry* (LC-MS/MS) con approcci *Bottom Up* e *Shot-gun*



Piattaforme tecnologiche

L'Unità è dotata di:

Apparecchiature Hardware:

- Cromatografia liquida ad ultra-alte prestazioni UHPLC UltiMate 3000 UHPLC RSLCnano System (Thermo Scientific)
- Spettrometro di massa Q-Exactive (Thermo Scientific)
- Sorgente ESI, electrospray ionization

Software:

- Chromeleon
- Xcalibur
- Proteome Discoverer
- MAX QUANT

Progetti di ricerca attivi:

- Cellule fetali dermiche per il trattamento di lesioni cutanee croniche: analisi dei mezzi condizionati per identificazione di proteine coinvolte in *pathway* rigenerativi quali angiogenesi e wound healing per mezzo della spettrometria di massa, software bioinformatici e database.
- *Pathways* molecolari e cellulari alla base della inibizione della funzione delle cellule NK indotta dal virus HCV al fine di ripristinare la corretta risposta immunitaria nel paziente HCV+ cronico: analisi dei mezzi condizionati di cellule Nk con varie stimolazioni per la individuazione dei meccanismi molecolari necessari e coinvolti nel ripristino della risposta immunitaria.
- Isolamento e caratterizzazione *in vitro* di cellule epiteliali e mesenchimali umane con caratteristiche di staminalità da sottoporre a diverse tipologie di studio *in vitro*. Analisi dei mezzi condizionati e dei pellet risultanti da cellule primarie isolate da placenta, *Label free* e marcate con TMT, per individuare possibili protagonisti di staminalità da esse prodotti, e verifica di eventuali modulazioni a diverse condizioni di cocultura tra mesenchimali ed epiteliali.

Pubblicazioni

Gaetani M., Chinnici C., Carreca A.P., Amico G., Conaldi P.G. Unbiased and quantitative proteomics reveals highly increased angiogenesis induction by the secretome of mesenchymal stromal cells isolated from fetal rather than adult skin. J. Tissue Eng. Regen. Med. 2017 Jan 19. Doi. 10.1002/term.2417 (IF: 3.989)

BILANCIO DI PREVISIONE TRIENNALE 2018 - 2020

	Fondo	Fondo
Stipendio iniziale	350.000.000	350.000.000
risultato della gestione		
Apporti fondatori		
Benefici di assegnazione GGA		
Progressioni effettive		
Utilizzi del periodo		
Totale	45.510.451	45.510.451
Stipendio iniziale	51.000	51.000
Benefici di assegnazione GGA	2.768.334	2.768.334
Progressioni effettive		
Utilizzi del periodo		
Totale	42.900.000	42.900.000
Stipendio iniziale	330.000.000	330.000.000
Benefici di assegnazione GGA		
Progressioni effettive		
Utilizzi del periodo		
Totale	45.510.451	45.510.451



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 evidentemente un'attività strategica per la Fondazione. Per questa ragione è stata costituita un'Area Grants, che svolge una costante attività di ricerca, selezione e presentazione di progetti a valere su bandi comunitari, ministeriali e regionali al fine di attivare programmi di ricerca, anche in collaborazione con altri enti.

L'Area Grant promuove e incentiva tutte le iniziative mirate al reperimento di fondi per lo sviluppo di proposte progettuali nelle aree di ricerca proprie di Ri.MED, occupandosi di individuare il fabbisogno e le potenzialità della Fondazione; selezionare i programmi finanziari a sostegno della ricerca biomedica, della formazione specialistica e della cooperazione internazionale; gestire i rapporti con le amministrazioni titolari dei programmi di finanziamento; coordinare e supervisionare i progetti approvati.

Nel 2017 sono stati finanziati cinque progetti, che permetteranno di acquisire apparecchiature sofisticate, formare figure altamente specializzate e condurre ricerche di grande utilità per la salute umana, allargando e rafforzando al tempo stesso la rete di collaborazioni a livello internazionale.

Il 2017 è stato inoltre un anno caratterizzato da forte progettualità: sono stati sottomessi otto progetti a valere su finanziamenti PO FESR Sicilia, quattro a valere su PON Ricerca e Innovazione e undici proposte per Dottorati di ricerca innovativi a caratterizzazione industriale.

PROGETTI DI RICERCA FINANZIATI NEL 2017

Ente Finanziatore:

Assessorato alle Attività Produttive
della Regione Siciliana
Patto per il Sud

CHEMIST - Computational Molecular Design e Screening

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.

Ente Finanziatore:

Ministero della Salute
Ricerca Finalizzata 2013

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

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.

Ente Finanziatore:

Assessorato alle Attività Produttive
della Regione Siciliana
PO FESR Sicilia 2014-2020

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

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.

Ente Finanziatore:

Commissione Europea
*Ricerca e Innovazione
Azione SC1-PM-17*

OACTIVE-Advanced personalised, multi-scale computer models preventing OsteoArthritis

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.

Ente Finanziatore:

Ministero della Salute
Ricerca Finalizzata 2016

Genetic variations that predict cognitive impairment related to copper failure

Obiettivo del progetto è identificare e convalidare i geni e le variabili biologiche che si associano alla malattia di Alzheimer, al disturbo cognitivo lieve e al diabete di tipo 2 e che possono predire il declino.

PROGETTI DI RICERCA PRESENTATI NEL 2017

Ente Finanziatore:
Assessorato alle Attività Produttive
della Regione Siciliana
PO FESR Sicilia 2014-2020
Azione 1.1.5 - OT1 - Scienze della Vita

SENSore Nanstrutturato per Stress Ossidativo - SE.N.SO

Partner capofila: Di Pietro GROUP

Immunoterapia contro Klebsiella - KLEBS

Partner capofila: Charybdis s.r.l.

Oncological therapies through Biological Interaction Network Discovery - OBIND

Partner capofila: Exprivia s.r.l.

Prodotti Medicinali Derivati da Placenta per Terapie Avanzate e per Patologie Epatiche e Endometriali - PROMETEO

Partner capofila: Casa di Cura Candela S.p.A.

Rete Integrata Clinico-Biologica- Elettronica di Biobanche per Medicina Rigenerativa- e-RIMedRi

Partner capofila: Pyxis s.r.l.

Piattaforma Computazionale per la Valutazione non Invasiva e il Supporto Clinico Decisionale in Pazienti con Aneurisma Toracico dell'Aorta Ascendente - AORTIVIEW

Partner capofila: Orobix s.r.l.

Test Exosome-based per medicina di precisione in malattie di origine autoimmune e cardiovascolari - EXO-PREMIA

Capofila: Locorotondo s.r.l.

Valorizzazione biotecnologica dei sottoprodotti del settore Ittico - BIOITTIVO

Partner capofila: Profineco s.r.l.

Ente Finanziatore:
Ministero dell'Istruzione,
dell'Università e della Ricerca
PON Ricerca e Innovazione 2014-2020

Advanced manufacturing technologies for regenerative and reconstructive medicine -Regen-MED

Linea di Specializzazione: Salute

Partner capofila: Università degli Studi di Catania

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

Linea di specializzazione: Chimica Verde

Partner capofila: Università degli Studi di Palermo

4FRAILITY - Sensoristica intelligente, infrastrutture e modelli gestionali per la sicurezza di soggetti fragili

Linea di specializzazione: Tecnologie per gli ambienti di vita

Partner capofila: Distretto Tecnologico Micro-Nano

TaRgeting cAnCer Epigenome - TRACE

Linea di specializzazione: Salute

Partner capofila: Università degli Studi della Campania "L. Vanvitelli"

Ente Finanziatore:
Commissione Europea
Horizon 2020

BIOMITRAL - Engineering the mitral valve: bioinspired control of structure and function for enhanced in-vivo performance.

Principal Investigator: Antonio D'Amore

Host Institution: Fondazione Ri.MED

Partner: IRCCS ISMETT

MAMMA - Marine Alkaloids for anti-Malignant Mesothelioma Activity

Soggetto proponente: Università degli Studi di Palermo

Principal Investigator: Girolamo Cirrincione

Partners: Fondazione Ri.MED; Fondazione IRCCS Istituto Nazionale Dei Tumori; Istituto Nazionale Biostrutture e Biosistemi (INBB).

DOTTORATI DI RICERCA INNOVATIVI A CARATTERIZZAZIONE INDUSTRIALE

ATTIVATI NEL 2017

Understanding the relationship between normal function and aberrant aggregation: the case of ataxin-3

Università promotrice: Università degli Studi di Palermo

Università estera: University of London, UK

Soggetto industriale: IRCCS ISMETT

Tutor aziendale: Alfano Caterina, Fondazione Ri.MED

PRESENTATI NEL 2017

Network di interazione da Big Data biologici: analisi del miRNoma customizzato

Università promotrice: Università degli Studi di Palermo; PdD in Scienze economiche e statistiche; Coordinatore PhD: Andrea Consiglio

Università estera: University of Pittsburgh, USA

Soggetto industriale: UPMC Italy

Tutor aziendale: Claudia Coronello, Fondazione Ri.MED

Caratterizzazione ed ingegnerizzazione di miocardio

Università promotrice: Università degli Studi di Palermo; PhD in Tecnologia e Scienze per la Salute dell'Uomo; Coordinatore PhD: Maurizio Leone

Università estera: University of Pittsburgh, USA

Soggetto industriale: UPMC Italy

Tutor aziendale: Antonio D'Amore, Fondazione Ri.MED

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; PhD in Neuroscienze;

Coordinatore PhD: Salvatore Salomone

Università estera: University of Pittsburgh, USA

Soggetto industriale: UPMC Italy

Tutor aziendale: Pier Giulio Conaldi, Fondazione Ri.MED

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

Università promotrice: Università degli Studi di Messina; PhD in Ricerca in Biotecnologie Mediche e Chirurgiche; Coordinatore PhD: Giovanni Raimondo

Università estera: Centre of Molecular Inflammation Research, NOR

Soggetto industriale: UPMC Italy

Tutor aziendale: Pier Giulio Conaldi, Fondazione Ri.MED

Sviluppo di sistemi microfisiologici per la modellazione di patologie articolari

Università promotrice: Università degli Studi di Palermo; PdD in Information and Communication Technologies; Coordinatore PhD: Ilenia Tinnirello

Università estera: University of Pittsburgh, USA

Soggetto industriale: UPMC Italy

Tutor aziendale: Pier Giulio Conaldi, Fondazione Ri.MED



Sviluppo di farmaci attivi nella terapia a bersaglio molecolare

Università promotrice: Università degli Studi di Messina; PhD in Ricerca in Biologia Applicata e Medicina Sperimentale; Coordinatore PhD: Salvatore Cuzzocrea

Università estera: University of Vienna, AUT

Soggetto industriale: Sterling Farmaceutici Srl

Tutor aziendale: Alessandro Padova, Fondazione Ri.MED

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

Università promotrice: Università degli Studi di Palermo; PhD in Ricerca in Scienze molecolari e biomolecolari; Coordinatore PhD: Patrizia Diana

Università estera: University of Vienna, AUT

Soggetto industriale: UPMC Italy

Tutor aziendale: Alessandro Padova, Fondazione Ri.MED

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; PhD in Ingegneria dell'innovazione tecnologica; Coordinatore PhD: Salvatore Gaglio

Università estera: University of Vienna, AUT

Soggetto industriale: QWince

Tutor aziendale: Alessandro Padova, Fondazione Ri.MED

Modeling micromeccanico delle patologie aortiche

Università promotrice: Università degli Studi di Palermo; PhD in Tecnologia e Scienze per la Salute dell'Uomo; Coordinatore PhD: Maurizio Leone

Università estera: Ecole Mines Saint Etienne, FRA

Soggetto industriale: UPMC Italy

Tutor aziendale: Salvatore Pasta, Fondazione Ri.MED

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

Università promotrice: Università degli Studi di Messina; PhD in Ricerca in Biotecnologie Mediche e Chirurgiche; Coordinatore PhD: Giovanni Raimondo

Università estera: Centre of Molecular Inflammation Research, NOR

Soggetto industriale: UPMC Italy

Tutor aziendale: Pier Giulio Conaldi, Fondazione Ri.MED

PORTFOLIO BREVETTI DELLA FONDAZIONE RI.MED AL 31. 12. 2017

SCOPERTA DI NUOVI FARMACI

Nitro-oleic acid (NO₂-OA) controlled release platform to induce regional angiogenesis in abdominal wall repair.

Titolarità: Fondazione Ri.MED e Università di Pittsburgh

Novel nitro-nitrate-lipid intermediates that mediate nitrosating and alkylating reactions

Titolarità: under discussion

MEDICINA RIGENERATIVA E IMMUNOTERAPIA

NK-mediated immunotherapy and uses thereof

Titolarità: Fondazione Ri.MED e IRCCS ISMETT

Probiotic yeasts as novel vaccination vectors.

Titolarità: Fondazione Ri.MED e IRCCS ISMETT

INGEGNERIA DEI TESSUTI E DISPOSITIVI BIOMEDICALI

Mandrel-less electrospinning processing method and electrodes for bio-mimetic tendinous tissue engineering.

Titolarità: Fondazione Ri.MED e Università di Pittsburgh

Method and system for the evaluation of the risk of an ascending thoracic aortic aneurysm.

Titolarità: Fondazione Ri.MED

Trans-atrial access for transcatheter valve repair or replacement.

Titolarità Fondazione Ri.MED e Università di Pittsburgh

Bi-layer Polyurethane - Extra Cellular Matrix Scaffolds for Improved Ischemic Ventricular Wall Remodeling.

Titolarità: Fondazione Ri.MED e Università di Pittsburgh

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

Titolarità: Fondazione Ri.MED e Università di Pittsburgh

A Retrievable Self-expanding Non-thrombogenic Low-profile Percutaneous Tricuspid Valve Prosthesis.

Titolarità: Fondazione Ri.MED e Università di Pittsburgh

A Method to Characterize the Complete Fiber Network Topology of Planar Fibrous Tissues and Scaffolds.

Titolarità: Fondazione Ri.MED e Università di Pittsburgh

Three-layered, bio-inspired, small-diameter vascular graft for tissue engineering applications.

Titolarità: Fondazione Ri.MED e 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.

Titolarità: Fondazione Ri.MED e Università di Pittsburgh

**Prevention of soft tissue ossification by controlled release.**

Titolarità: Fondazione Ri.MED e Università di Pittsburgh

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

Titolarità: Fondazione Ri.MED e Università di Pittsburgh

Recruitment of mesencymal stem cells using controlled release systems.

Titolarità: Fondazione Ri.MED e Università di Pittsburgh

Polyvinylpyrrolidone and Stearic acid coated Cranberry Extract for the Prevention of Dental Biofilm.

Titolarità: Fondazione Ri.MED e Università di Pittsburgh

An organ chip to model mammalian joint.

Titolarità: Fondazione Ri.MED e Università di Pittsburgh

High throughput mechanical activation device.

Titolarità: Fondazione Ri.MED e Università di Pittsburgh

Ethyl lauroyl arginate and Stearic acid coated Cranberry Extract for the Prevention of Dental Biofilm.

Titolarità: Fondazione Ri.MED e Università di Pittsburgh

Enhancing cranberry extract residence time on biofilm and pellicle-2.

Titolarità: Fondazione Ri.MED e Università di Pittsburgh

A Stentless Biopolymer Heart Valve Replacement Capable of Living Tissue Regeneration.

Titolarità: Fondazione Ri.MED e Università di Pittsburgh

An Expandable Percutaneous Venous Cannula for Use in Extracorporeal Cardiopulmonary Support.

Titolarità: Fondazione Ri.MED e Università di Pittsburgh



Fondazione
Ri.MED

Via Bandiera, 11 - 90133 Palermo, Italy
Tel. +39 091 6041111 - Fax +39 091 6041122
info@fondazionerimed.com
www.fondazionerimed.com