



Fondazione
Ri.MED



REPORT
SCIENTIFICO
2020

REPORT SCIENTIFICO 2020

SOCI FONDATORI



PARTNER



A MEDITERRANEAN
HUB FOR TRANSLATIONAL
RESEARCH

IMMAGINE DI COPERTINA:

Cellule staminali mesenchimali umane derivate dal midollo osseo (hBMSCs) adese sulla superficie di uno scaffold di acido poli-(D)-lattico iperelastico, marcate con falloidina fluorescente.



Alessandro Padova
DIRETTORE GENERALE

Il 2020 ha segnato per la Fondazione Ri.MED un anno decisivo: con l'avvio del cantiere a Carini, in provincia di Palermo, è stata posta la pietra miliare per la costruzione del **Centro per le Biotecnologie e la Ricerca Biomedica (CBRB)**. Un successo che premia l'incessante lavoro delle nostre risorse, coinvolte a vario titolo nella realizzazione del progetto, ma anche per i nostri partner fondatori, sia quelli italiani - Presidenza del Consiglio dei Ministri, Regione Siciliana e CNR - che per i partner statunitensi - Università di Pittsburgh e UPMC. Grande merito va attribuito all'ANAC e alla Prefettura di Palermo per gli **accordi di legalità e anticorruzione** che hanno permesso di garantire la correttezza e la trasparenza delle procedure in ogni fase.

Nel 2020 è stata avviata la **transizione verso una nuova struttura organizzativa**, necessaria per accogliere le sfide future e in linea con la visione strategica del **cluster UPMC-IRCCS ISMETT-Ri.MED**. Le strutture amministrativo-gestionali e di ricerca&sviluppo sono andate consolidandosi nel corso dell'anno e il processo proseguirà nel 2021. È importante sottolineare **il grande impegno profuso e la passione dimostrata da tutte le risorse Ri.MED** in un periodo tanto impegnativo, segnato da una grave pandemia, che ha imposto - tra le altre cose - una notevole flessibilità anche nelle modalità di lavoro.

Sono stati raggiunti importanti risultati sia rispetto agli obiettivi istituzionali, che in termini di ricerca traslazionale e formazione. I nostri scienziati, supportati dagli uffici amministrativi, hanno ampliato i programmi di ricerca e sviluppo, ricevendo importanti riconoscimenti e attirando finanziamenti pubblici e privati, tra cui il prestigioso ERC Consolidator Grant. Nel 2020 è stata inoltre fondata la start-up NEOOLIFE, nata sulla base della PI in co-titolarità con l'Università di Pittsburgh.

Ringrazio il Direttore Scientifico Prof. Dario Vignali per la proficua collaborazione e la continua leadership, i Membri del Comitato Scientifico per i consigli nello sviluppo di una strategia traslazionale e il Dott. Angelo Luca, Direttore dell'IRCCS ISMETT, per un anno di partnership estremamente produttivo. Un riconoscimento va a tutti i membri del Consiglio di Amministrazione ed in particolare alla **guida del Presidente Paolo Aquilanti e del Vice Presidente Bruno Gridelli**. Ringrazio infine il nostro consulente legale Giuseppe Mazzarella per il quotidiano e costruttivo confronto, finalizzato allo sviluppo di un futuro sostenibile per Ri.MED.



Dario Vignali
DIRETTORE SCIENTIFICO

Benvenuti all'edizione 2020 del nostro annuale Report Scientifico. Qui troverete una panoramica dei progetti di ricerca in corso, delle competenze dei team Ri.MED e delle tecnologie disponibili, ovvero degli elementi chiave necessari per puntare alle nostre mission: **tradurre la ricerca biomedica e biotecnologica in terapie innovative per i pazienti e facilitare la formazione della nuova generazione di scienziati biomedici italiani**.

La ricerca Ri.MED si concentra su cinque aree terapeutiche: **cancro**, con particolare attenzione all'immunoterapia, **insufficienza d'organo**, che include trapianto di organi e medicina rigenerativa, **malattie dell'invecchiamento**, con particolare attenzione alla **neurodegenerazione**, e **malattie infettive**, con particolare attenzione alle malattie rilevanti per l'area mediterranea.

La pandemia COVID-19 esplosa nel 2020 ha presentato enormi sfide per tutti, compreso Ri.MED: non abbiamo potuto svolgere i nostri eventi in presenza, il Simposio Scientifico annuale e il Ri.MED Research Retreat, ma abbiamo continuato le attività di ricerca, inclusi **i nuovi progetti sul COVID-19**.

L'impegno e lo sforzo del nostro **Comitato Scientifico** - composto dai Professori Lucia Altucci, Ivet Bahar, Antonino Cattaneo, Francesco Dieli e George Fadi Lakkis - è stato costante. Nel corso del 2020 è stata rafforzata la comunicazione tra il Comitato Scientifico e gli scienziati Ri.MED grazie all'istituzione del **Comitato di Coordinamento Ricerca&Sviluppo Ri.MED**, composto da Caterina Alfano, Group Leader in Biologia Strutturale e Biofisica, Gaetano Burriesci, Group Leader in Bioingegneria e Dispositivi medici, Antonio D'Amore, Group Leader in Ingegneria dei tessuti, Giovanna Frazziano, Coordinatrice del gruppo di Medicina Rigenerativa e Ugo Perricone, Group Leader in Informatica Molecolare.

Un evento particolarmente significativo del 2020 è stato l'avvio del cantiere per la costruzione del Centro Ri.MED per le Biotecnologie e la Ricerca Biomedica in Sicilia. L'impegno per l'eccellenza e la crescita dei nostri ricercatori, l'ambiente internazionale e multidisciplinare e la ricca rete di collaborazioni sono ciò che mi rende orgoglioso di far parte di Ri.MED e della sua mission.

INDICE

Ri.MED OVERVIEW 6

Formazione	8
Diffusione del sapere scientifico	10
Networking	12
CBRE	14
Public engagement	16
Gruppi di Ricerca	18

Ri.MED IN PRIMA LINEA CONTRO IL COVID-19 22

SVILUPPO DI NUOVI FARMACI 26

Caratterizzazione strutturale di proteine da SARS-CoV-2 Caterina Alfano, PhD	28
Meccanismi molecolari delle malattie da <i>misfolding</i> proteico Caterina Alfano, PhD	30
Studi strutturali per elucidare il meccanismo di oligomerizzazione della proteina nucleofosmina NPM1 Caterina Alfano, PhD	32
Studi strutturali e biofisici per sondare l'interazione di KDM4a con potenziali inibitori Caterina Alfano, PhD	34
Ruolo dell'inflammasoma NLRP3 e alterazioni immuno-metaboliche nella broncopneumopatia cronica ostruttiva (BPCO) Chiara Cipollina, PhD	36
Sviluppo di algoritmi di IA per l'estrazione e la selezione di caratteristiche radiomiche dalle immagini biomediche Albert Comelli, PhD	38
Sviluppo di algoritmi automatici 3D per la segmentazione e la classificazione di immagini biomediche Albert Comelli, PhD	40
Sviluppo di algoritmi per modellizzare il network di interazione di microRNA e relativi target Claudia Coronello, PhD	42
Progettazione di inibitori non covalenti di NLRP3 nella patologia infiammatoria Ugo Perricone, PhD	44
Progettazione di modulatori della Istone lisina demetilasi 4 (KDM4) come agenti antitumorali Ugo Perricone, PhD	46

MEDICINA RIGENERATIVA E IMMUNOTERAPIA 48

I laboratori Ri.MED di Medicina Rigenerativa e Immunoterapia insieme ad IRCCS ISMETT	50
Ingegnerizzazione delle cellule CAR-NK per il trattamento dell'epatocarcinoma cellulare Ester Badami, PhD	51
Cellule Dendritiche regolatorie nella prevenzione del rigetto di organo Ester Badami, PhD	54
Ottimizzazione di approcci di tipo <i>cell-based</i> per il riparo di ferite cutanee croniche: soluzioni di rilascio del secretoma a base di biomateriali Cinzia Chinnici, PhD	56
Creazione di cellule pluripotenti indotte umane (iPSCs) come modello <i>in vitro</i> per lo studio di malattie del fegato Cinzia Chinnici, PhD	58
Sviluppo di un vaccino contro <i>Klebsiella pneumoniae</i> Bruno Douradinha, PhD	60
Meccanismi di immunoevasione di <i>Klebsiella pneumoniae</i> Bruno Douradinha, PhD	62
Sorveglianza e caratterizzazione di ceppi batterici multiresistenti di rilevanza clinica Bruno Douradinha, PhD	64
Cluster linfoidi associati al grasso (FALC) come nicchie espandibili per lo sviluppo di un fegato ectopico Maria Giovanna Francipane, PhD	66
OActive - Modelli computazionali avanzati, personalizzati, e multiscala per la prevenzione dell'OsteoArtrite Riccardo Gottardi, PhD	68
Sviluppo di un modello <i>ex vivo</i> di osteoartrite per il test di nuovi farmaci Riccardo Gottardi, PhD	70
Linfociti T multi-virus specifici per il trattamento delle infezioni virali post trapianto Monica Miele, PhD	72
Studio di cellule mesenchimali stromali da placenta umana per applicazioni in medicina rigenerativa e possibili terapie epatiche Mariangela Pampalone	74
iRhom2: un nuovo target terapeutico in osteoartrosi? Simone Dario Scilabra, PhD	76
iRhom2 regola i livelli delle molecole MHC di classe I e risposte immunitarie Simone Dario Scilabra, PhD	78

INGEGNERIA DEI TESSUTI E DISPOSITIVI MEDICI 80

Sviluppo di bio-adesivi non tossici per ambienti acquosi Caterina Alfano, PhD	82
Sviluppo di una valvola cardiaca transcateretere innovativa Gaetano Burriesci, PhD	84
Sviluppo di una valvola cardiaca in tessuto animale priva di Alfa-Gal Gaetano Burriesci, PhD	86
Analisi dell'appendice atriale sinistra per la predizione del rischio di trombosi Gaetano Burriesci, PhD	88
Simulazioni numeriche <i>Smoothed Particle Hydrodynamics</i> (SPH) per applicazioni di bioingegneria cardiovascolare Gaetano Burriesci, PhD	90
Caratterizzazione termomeccanica di biomateriali superelastici Ni-Ti Gaetano Burriesci, PhD	92
Bioreattori per l'elaborazione e deposizione di matrice extracellulare (BE-ECM) Antonio D'Amore, PhD	94
Modelli numerici per la meccanica e la crescita tissutale di tessuti nativi ed ingegnerizzati (NET-MTG) Antonio D'Amore, PhD	96
Analisi strutturale ed istopatologica per immagini di tessuti nativi ed ingegnerizzati (NET-IBA) Antonio D'Amore, PhD	98
Parete di miocardio ingegnerizzata (TECP) Antonio D'Amore, PhD	100
Valvole cardiache ingegnerizzate (TEHV) Antonio D'Amore, PhD	103
Vasi sanguigni ingegnerizzati (TEVG) Antonio D'Amore, PhD	107
R-CaRe - Riabilitazione per la rigenerazione della Cartilagine Riccardo Gottardi, PhD	110
Sviluppo di uno <i>scaffold</i> ingegnerizzato iperelastico per la rigenerazione dell'entesi tendinea Riccardo Gottardi, PhD	112

PIATTAFORME TECNOLOGICHE 114

Bioinformatica	116
Bioingegneria	118
Biologia Strutturale e Biofisica	120
Cell Factory	122
Chimica Medicinale	124
High-throughput Screening	126
Imaging Biomedico e Radiomica	128
Informatica Molecolare	130
Proteomica	132

FINANZIAMENTI PER LA RICERCA 134

Progetti in corso di svolgimento	136
Progetti ammessi a finanziamento	138
Progetti sottomessi	139

PROPRIETÀ INTELLETTUALE E TRASFERIMENTO TECNOLOGICO 140

Portfolio brevetti al 31.12.2020	142
----------------------------------	-----



Networking



3

Accordi in essere per la gestione diretta di laboratori

31

Accordi di collaborazione scientifica e trasferimento tecnologico in essere

12

Accordi di collaborazione scientifica e trasferimento tecnologico stipulati nel 2020

Formazione e occupazione



61 Dipendenti nel 2020

59% 41%



30

Borse di studio

18 University of Pittsburgh

Borse di studio Post Doc presso L'Università di Pittsburgh

24

Borse per Dottorati di Ricerca

27

Tirocini

Proprietà intellettuale



circa 300

Publicazioni scientifiche

27

Brevetti depositati

Finanziamenti per la ricerca



19.174.193€

Aggiudicati su GRANT nazionali ed internazionali

8.000.000€

Contributo Regionale per il cluster Ri.MED - ISMETT

Diffusione del sapere scientifico



38 Meeting scientifici Ri.MED

9 Eventi interni Ri.MED

33 Partecipazioni ad eventi di settore

9 Eventi istituzionali Ri.MED

Il progetto CBRB



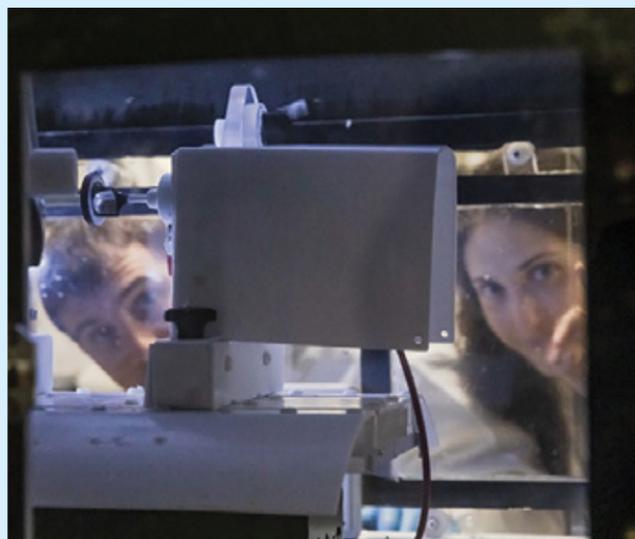
28.000 mq di laboratori

196.350.000€ il valore dell'investimento

600 Posti di lavoro previsti

FORMAZIONE Coltivare talenti

Ri.MED dedica grande impegno alla formazione di personale altamente qualificato, riconoscendone il ruolo decisivo per il successo delle sfide scientifiche e per lo sviluppo della competitività di tutto il territorio. Ad oggi Ri.MED ha attivato numerose opportunità formative, tra cui 27 tirocini, 30 borse di studio, 24 PhD e 18 Post-Doc fellowship: un trend in continuo aumento e destinato a progredire ulteriormente in vista della realizzazione del CBRB.



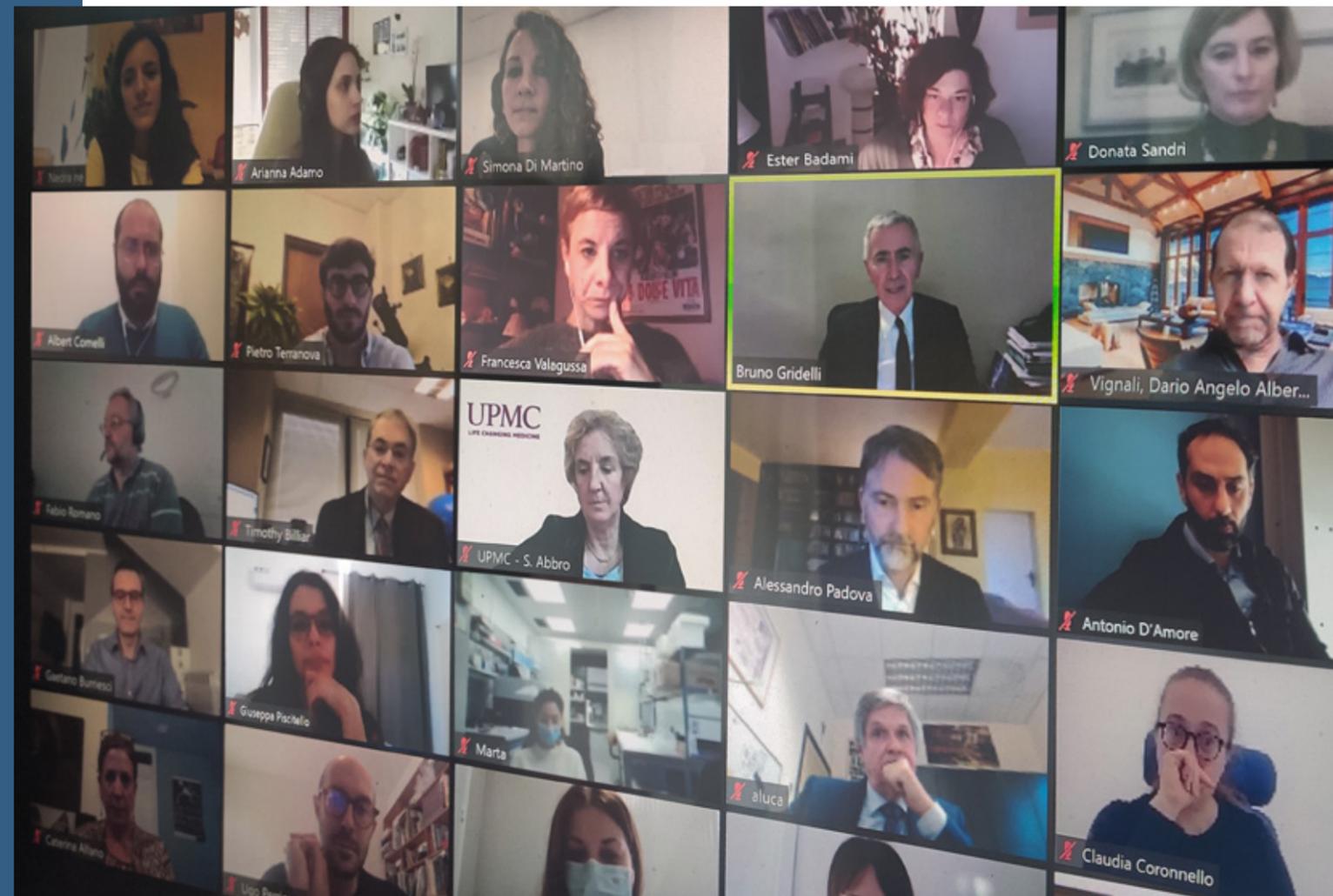
Alcuni di questi programmi sono resi possibili grazie alla partnership con l'Università di Pittsburgh, che ha già ospitato 18 post-doc nell'ambito della Fellowship Ri.MED, altri programmi di training sono stati attivati nell'ambito di finanziamenti ottenuti su bandi europei, ministeriali e regionali. Ri.MED ha inoltre ottenuto da FonARCom l'approvazione del Piano formativo "Innovation and

Development" rivolto ai propri dipendenti. Nel corso del 2020 si sono svolti 5 corsi di formazione aziendale, alternando la presenza - ove possibile - con la modalità in remoto: Leadership e coordinamento efficace delle HR, Team Working, Video Editor e Statistica applicata alla biomedicina, per un totale di 42 partecipanti e 98 ore di formazione erogata.

VALORIZZAZIONE E DIFFUSIONE DEL SAPERE SCIENTIFICO

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

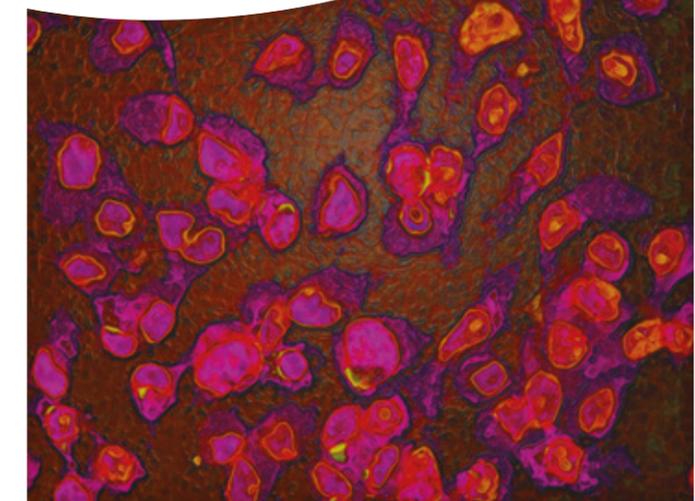
A causa delle misure di contenimento della pandemia Covid-19, gli eventi in presenza programmati per il 2020 sono purtroppo stati annullati, ma la Fondazione si è adoperata per trasferire in modalità on-line le occasioni di scambio di conoscenza. Ri.MED ha inoltre partecipato con due eventi alla Settimana Europea delle Regioni e delle Città, che si è svolta in remoto nel mese di ottobre.



CANCER IMMUNOLOGY RESEARCH

February 2020
Volume 8 | Number 2

Illuminating the Interplay of Cancer and the Immune System



IN COLLABORATION WITH  CANCER RESEARCH INSTITUTE

AACRJournals.org
@CIR_AACR

AACR American Association for Cancer Research



Il talk “Science: driving force for the Mediterranean”, guidato da Ri.MED, ha approfondito il ruolo della scienza per offrire centralità e opportunità di crescita a territori geograficamente isolati, come le isole di Cipro e Sicilia. Il workshop “Communicating Science #EngageAudience” ha inoltre visto la partecipazione di Ri.MED sul tema della diffusione del sapere scientifico nel territorio.

Il 2020 è stato un anno proficuo dal punto di vista delle pubblicazioni scientifiche, oltre una trentina gli articoli su *peer review journal* con rilevante *impact factor*, un contributo alla divulgazione scientifica di settore. L'ufficio stampa opera inoltre per veicolare i principali risultati della ricerca verso il più vasto pubblico di non addetti ai lavori, contribuendo così alla diffusione del sapere scientifico.

NETWORKING

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

Per questa ragione Ri.MED dedica grande attenzione al continuo sviluppo della propria rete di collaborazioni e convenzioni scientifiche con enti ed istituzioni di settore: ad oggi sono operativi 31 accordi per lo sviluppo dell'innovazione tecnologica, la promozione dell'attività di ricerca e la condivisione di laboratori e risorse con enti europei e statunitensi. Di questi, ben 12 sono stati stipulati nel corso del 2020.

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



CBRB

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

Ri.MED è impegnata nella realizzazione del Centro per le Biotecnologie e la Ricerca Biomedica (CBRB) a Carini, in provincia di Palermo. Il centro, che ospiterà anche un incubatore d'impresa, rappresenta un modello gestionale di partnership pubblico-privata, capace di dialogare con università ed enti di ricerca da una parte e con aziende farmaceutiche e biotecnologiche dall'altra, per sviluppare alleanze strategiche ed attrarre finanziamenti ed investimenti per la ricerca, con effetti positivi sull'economia del Mezzogiorno.



Il 2020 è stato l'anno di avvio dei lavori di costruzione: il 14 febbraio è stato ufficialmente consegnato il terreno e - nonostante la parentesi di interruzione forzata dovuta alle disposizioni in materia di sicurezza per il Covid-19 - il cantiere è stato avviato.

Per prima cosa sono stati espiananti e messi a dimora gli ulivi secolari presenti sul terreno, successivamente sono stati realizzati i primi interventi strutturali: gli scavi e il getto dei magroni di fondazione, il montaggio delle cassature perimetrali

degli uffici, degli ambulatori dell'auditorium e dei parcheggi, il montaggio di tutte e sei le gru, etc. L'ATI aggiudicataria della gara, capitanata da Italiana Costruzioni S.p.A. prosegue i lavori sotto la direzione del gruppo capitanato da HOK, già vincitore del concorso di idee per la progettazione del centro.

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

PUBLIC ENGAGEMENT

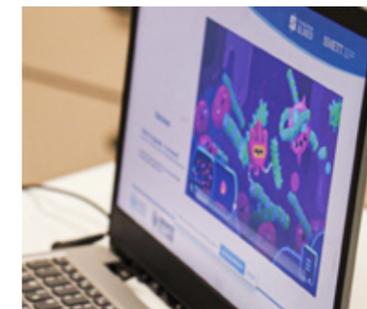
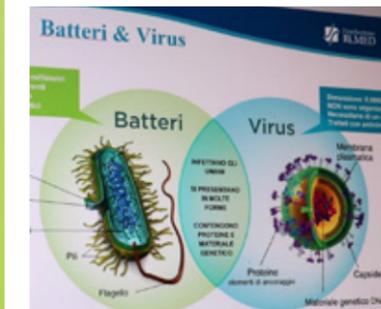
Coinvolgere ed ispirare un pubblico eterogeneo è una delle nostre priorità, per questo stiamo lavorando ad un programma di public engagement per coinvolgere cittadini di tutte le età, in collaborazione con i principali interlocutori del territorio. Il dialogo nella comunità locale deve portare allo sviluppo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



LA CURA È DENTRO DI TE!

IL NOSTRO CORPO CI OFFRE TANTO, A VOLTE ANCHE IL MODO PER TROVARE NUOVI TRATTAMENTI: DALLE CELLULE È POSSIBILE RICAVARE FARMACI BIOLOGICI E TERAPIE AVANZATE MENTRE STUDIANDO COME IL NOSTRO ORGANISMO COMBATTE I VIRUS, POSSIAMO TRARRE ISPIRAZIONE PER SVILUPPARE NUOVI VACCINI

Fondazione Ri.MED  UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI PALERMO  **SHARPER 27.11.2020**



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

Come per tutte le attività di contatto legate agli eventi, il 2020 è stato un anno fortemente penalizzato dalle restrizioni legate alla pandemia Covid-19; nonostante ciò, Ri.MED ha potuto partecipare alla Notte Europea dei Ricercatori, in

modalità on-line, con il laboratorio "La cura è dentro di te", erogare la prima parte dei laboratori "Research Friday" di scienze applicate al liceo STEM del CEI di Palermo ed avviare la collaborazione per il corso biennale dell'ITS Volta di Palermo, il primo istituto tecnico superiore in Sicilia specializzato in "nuove tecnologie della vita", finalizzato alla formazione di tecnici specializzati nell'utilizzo di dispositivi diagnostici e biomedicali.



GRUPPI DI RICERCA Ri.MED



ATMP - Advanced Therapy Medicinal Products

Regenerative Medicine and Immunotherapy



Giovanna Frazziano, PhD
GROUP COORDINATOR
gfrazziano@fondazionerimed.com

Bruno Douradina, PhD
Principal Investigator in Vaccine Development

Maria Giovanna Francipane, PhD
Principal Investigator in Regenerative Medicine

Cinzia Chinnici, PhD
Senior Scientist in Regenerative Medicine

Simona Corrao, PhD
Senior Scientist in Cellular isolation and transplantation

Roberto Di Gesù, PhD
Post Doctoral Researcher - Oactive

Mariangela Pampalone
Senior Specialist in Cell Biology

Ester Badami, PhD
Senior Scientist in Immunology

Daniele Galvagno
Senior Specialist in Cell Biology

Giandomenico Amico, PhD
Scientist in Biomedicine

Claudia Carcione
Laboratory Technician

Giampiero Vitale
Laboratory Technician

Diego S. Paini
Laboratory Technician

Salvatrice Lo Giudice
Laboratory Support

Ri.MED Lab c/o IRCCS ISMETT, Palermo



BIOENGINEERING

Bioengineering and Medical devices



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

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

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

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

Giulio Musotto
PhD student in Engineering of Technological Innovation

Alessia Viola
PhD student in Civil, environmental and materials engineering - CheMIST

Ri.MED Lab c/o Università di Palermo

Tissue Engineering



Antonio D'Amore, PhD
GROUP LEADER IN
TISSUE ENGINEERING
adamore@fondazionerimed.com

Arianna Adamo, PhD
Scientist in Cardiac Tissue Engineering Expert in Mechanobiology

Federica Cosentino, PhD
Scientist in Cardiac Tissue Engineering Expert in Numerical Methods or Biofabrication

Marianna Barbuto
PhD student in Technologies and Health Sciences

Pietro Terranova
PhD Student in Mechanical, Manufacturing, Management and Aerospace Innovation

Marzio Di Giuseppe
PhD student in Technologies and Health Sciences



PRECLINICAL RESEARCH & DEVELOPMENT

GMP Cell Factory



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

Danilo D'Apolito, PhD
Quality Control Manager

Monica Miele, PhD
GMP Production Manager

Francesca Timoneri, PhD
Scientist in Biomedicine

Mariangela Di Bella
Senior Specialist in Cell Production

Salvatore Pasqua
Laboratory Senior Technician

Ri.MED Lab c/o IRCCS ISMETT, Palermo

Preclinical Research



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

Rossella Alduino
Data Collector - Ricerca Finalizzata 2013/OBIND

Ri.MED Lab c/o Istituto Zooprofilattico, Palermo

 **DRUG DISCOVERY**

Structural Biology and Biophysics



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

Maria Agnese Morando, PhD
Post Doctoral Researcher in Structural Biology and Biophysics - CheMIST
Rosario Vallone, PhD
Post Doctoral Researcher in Structural Biology and Biophysics - CheMIST
Raffaele Sabbatella
Structural Biology Laboratory Technician - CheMIST
Elisa Monaca
Structural Biology Laboratory Technician
Francesca Venturella
PhD Student in Technologies and Health Sciences for Man - CheMIST
Martina Sollazzo
PhD student in Technologies and Health Sciences

Ri.MED Lab c/o ATeN Center- UNIPA, Palermo

Molecular Informatics



Ugo Perricone, PhD
GROUP LEADER IN
MOLECULAR INFORMATICS
uperricone@fondazionerimed.com

Giada De Simone
Scientist in Molecular Informatics - CheMIST
Nedra Mekni
Scientist in Computational Chemistry - CheMIST
Jessica Lombino
PhD Student in Molecular and Biomolecular Sciences
Maria Rita Gulotta
PhD Student in Molecular and Biomolecular Sciences - CheMIST
Serena Vittorio
PhD Student in Applied Biology and Experimental Medicine
Isabella Mendolia
PhD Student in Engineering of Technological Innovation
Ornella Randazzo
PhD Student in Molecular and Biomolecular Sciences
Salvatore Contino
PhD Student in Engineering of Technological Innovation
Camilla Pecoraro
PhD Student in Molecular and Biomolecular Sciences

Ri.MED Lab c/o Laboratori UNIPA - Via Marini, Palermo

Advanced Data Analysis



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

Albert Comelli, PhD
Scientist in Nuclear Magnetic Resonance
Walter Arancio, PhD
Post Doctoral Researcher in Bionformatics - OBIND
Giorgio Bertolazzi
PhD Student in Statistical and Economic Sciences

Ri.MED Lab c/o Laboratori UNIPA - Via Marini, Palermo

Medicinal Chemistry



Maria De Rosa, PhD
PRINCIPAL INVESTIGATOR IN
MEDICINAL CHEMISTRY
mderosa@fondazionerimed.com

Simona Di Martino, PhD
Senior Scientist in Medicinal Chemistry

Ri.MED Lab c/o Laboratori UNIPA - Via Marini, Palermo

Identification of Therapeutic Targets and Screening



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

Marco Buscetta, PhD
Laboratory Technician - CheMIST
Giovanni Zito, PhD
Post Doctoral Researcher in Imaging
Marta Cristaldi, PhD
Laboratory Technician
Maura Cimino, PhD
Post Doctoral Researcher in Imaging - CheMIST
Paola Dino
PhD Student Biomedicine and neuroscience
Agnese La Mensa
PhD Student Biomedicine and neuroscience

Ri.MED Lab c/o IRIB CNR, Palermo

Proteomics



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

Anna Paola Carreca
Scientist in Proteomics - CheMIST
Matteo Calligaris
PhD Student - iRhom2
Simone Bonelli
PhD student in Technologies and Health Sciences

Ri.MED Lab c/o IRCCS ISMETT, Palermo

Ri.MED SUPPORTED SCIENTIST



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





Ri.MED IN PRIMA LINEA CONTRO IL COVID-19

INFORMATICA MOLECOLARE E CHIMICA MEDICINALE

SPIKE

Team Ri.MED: Gruppo di Chimica Computazionale e Gruppo di Chimica Medicinale

ABSTRACT

Lo studio è focalizzato sulla fase iniziale del ciclo virale, ossia l'ingresso del virus nella cellula ospite. Infatti, con approcci computazionali diversi è stato studiato il meccanismo con cui il virus lega la cellula ospite tramite l'interazione proteina-proteina tra la glicoproteina virale Spike e la proteina umana ACE2 (Angiotensin-converting enzyme 2), con l'obiettivo di identificare i residui chiave e poter avviare una campagna di progettazione di nuovi chemotipi su questo bersaglio terapeutico. Le tecniche *in silico* adottate su Spike, tra cui *alanine scanning* e dinamica molecolare, hanno permesso di identificare *hot spot* della proteina Spike e valutarne, da un punto di vista quali-quantitativo, il coinvolgimento nella stabilizzazione del complesso *host-guest*. Sulla regione identificata è stata condotta una campagna di *virtual screening* di 2 milioni di molecole. Lo screening ha permesso l'identificazione di una serie di molecole in grado di inibire potenzialmente l'interazione della proteina Spike con il recettore umano ACE 2.

RISULTATI

Selezione di 1000 composti da testare sul target Spike di Sars-CoV-2.

PUBBLICAZIONI

Gulotta et al., ChemMedChem 2020, 15, 1921-1931

Mpro

Team Ri.MED: Gruppo di Chimica Computazionale, Gruppo di Chimica Medicinale e Gruppo di Bioinformatica

ABSTRACT

Lo studio riguarda una fase più tardiva del ciclo virale, che coinvolge la *Main protease* (Mpro), uno degli enzimi responsabili della maturazione di proteine virali strutturali e funzionali. Mpro promuove infatti il clivaggio di poliproteine in proteine più piccole mature che si assemblano producendo nuovi virioni infettivi, e quindi responsabili della propagazione dell'infezione nelle cellule e tessuti contigui. Mpro rappresenta pertanto un potenziale target per una terapia antivirale specifica per pazienti COVID-19. Lo scopo è quello di progettare nuovi inibitori di Mpro al fine di ostacolare e danneggiare il macchinario di replicazione virale. E' in fase di completamento il lavoro di selezione di composti potenzialmente attivi su MPro. In particolare, i gruppi di Informatica Molecolare e Chimica Medicinale stanno collaborando con il gruppo di Advanced Data Analysis per l'adozione di approcci quantitativi basati su tecniche di *machine learning*; con l'obiettivo di ottimizzare la selezione *in silico* di *hits* sul target Mpro, ottenuta attraverso tecniche classiche di *virtual screening ligand-based*.

RISULTATI

Selezione di 1000 composti con metodi classici e 100 con tecniche di *Machine Learning* da testare sul target Mpro.

JEDI Grandchallenge Billion molecules against Covid-19

TEAM Ri.MED: Gruppo di Chimica Computazionale e Gruppo di Chimica Medicinale

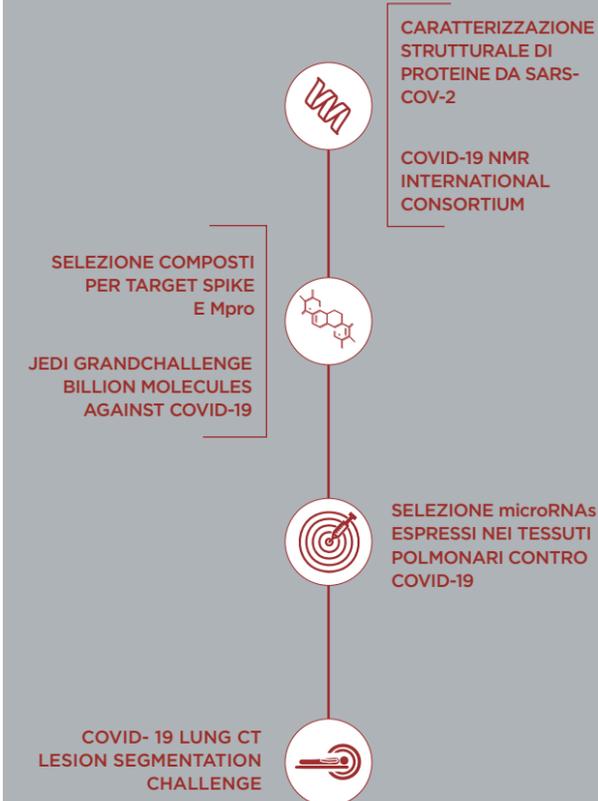
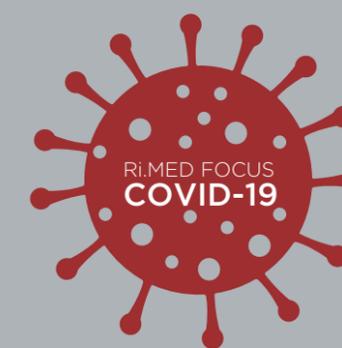
ABSTRACT

Il gruppo Ri.MED di Chimica Computazionale, guidato da Ugo Perricone, con la collaborazione di Maria De Rosa, Principal Investigator in Chimica Medicinale, ha partecipato al bando e inviato alla commissione di JEDI i composti identificati come più promettenti secondo i calcoli *in silico*. L'ente promotore ha raccolto e confrontato i risultati ottenuti dai teams di ricerca di tutta Europa: le molecole comuni selezionate dai vari gruppi sono state valutate in un primo step, sulla base delle metodiche computazionali utilizzate e raggruppate in cluster di similarità per eliminare ridondanze di chemotipi. Il secondo step di valutazione è stato lo studio di fattibilità sintetica dei composti, ovvero stabilire se questi possano effettivamente essere realizzati e - in caso positivo - che non siano tossici. La strategia è stata quella di creare un *workflow* computazionale basato sul consenso di più algoritmi che creassero dei filtri in grado di minimizzare i falsi positivi ritrovati dallo screening virtuale. Questo approccio permette di avere dei criteri di selezione delle molecole molto stringenti. La vera forza degli approcci utilizzati risiede poi nel confronto continuo con il gruppo di Chimica Medicinale, al fine di valutare che i risultati ottenuti con metodologie *in silico* siano allineati con la Chimica Medicinale.

RISULTATI

Da un miliardo di molecole di partenza si è arrivati ad identificarne 1000 potenzialmente utili, provenienti da tutta Europa. Di queste, 65 appartengono al team Ri.MED. Si tratta di un risultato davvero lusinghiero, a dimostrazione dell'ottimo lavoro di squadra svolto dal gruppo di Chimica Computazionale e Medicinale.

Il 2020 è stato segnato a livello mondiale dalla terribile pandemia di Covid-19, causata dal virus SARS-CoV-2, che ha avuto gravi ripercussioni sociali ed economiche. Parallelamente ai programmi di ricerca e sviluppo propri della Fondazione, i nostri scienziati hanno quindi voluto dare il proprio contributo, intraprendendo nuovi progetti scientifici e collaborazioni focalizzati sul Covid-19.



BIOLOGIA STRUTTURALE E BIOFISICA

Caratterizzazione strutturale di proteine da SARS-CoV-2

TEAM Ri.MED: Gruppo di Biologia Strutturale e Biofisica

PARTNERSHIP

- UK Dementia Research Institute (UK DRI) - King's College London, London, United Kingdom.
- European Brain Research Institute Rita Levi Montalcini (EBRI), Rome, Italy
- Scuola Normale Superiore of Pisa (SNS), Pisa, Italy
- Molecular Medicine Department - University of Pavia, Pavia, Italy
- Covid19-NMR International Consortium

ABSTRACT

L'infezione da sindrome respiratoria acuta grave da coronavirus 2 (SARS-CoV-2) è già la terza infezione da coronavirus che si è verificata nel terzo millennio. L'epidemia ha colpito la popolazione mondiale per tutto il 2020 ed è ancora in corso. Questa situazione sottolinea l'importanza di acquisire una comprensione profonda dei meccanismi che regolano l'internalizzazione e la riproduzione virale e la necessità di tradurre questa conoscenza in trattamenti. Come gruppo di Biologia Strutturale e Biofisica, ci siamo concentrati sulla proteina non strutturale 9 (nsp9) e sulla proteina accessoria 8 (orf8), entrambe di estrema rilevanza biologica e terapeutica. Nsp9 è una proteina dimerica legante ssRNA altamente conservata tra i Beta-coronavirus ed è coinvolta nel meccanismo di replicazione virale. La delezione di nsp9 in modelli murini impedisce la sintesi di RNA e l'infezione, indicando che nsp9 è fondamentale per la replicazione virale. Orf8 invece sembra essere responsabile dell'evoluzione dei Betacoronavirus e dei loro salti di specie, oltre ad avere un ruolo nel deprimere la risposta dell'ospite. Infatti, orf8 riduce la trascrizione del complesso MHC di classe I, compromettendo l'azione dei linfociti T dell'ospite sulle cellule infette. La validità di orf8 come target terapeutico è ulteriormente confermata dalla ridotta aggressività di SARS-CoV-2 in pazienti infettati da virus con delezione del gene orf8.

RISULTATI

Abbiamo disegnato e prodotto i costrutti genici per esprimere le proteine ricombinanti nsp9 e orf8. Per la proteina nsp9 abbiamo inoltre messo a punto il protocollo di purificazione, effettuato la caratterizzazione biofisica mediante dicroismo circolare (CD), e risonanza magnetica nucleare (NMR), ed eseguito l'assegnazione delle risonanze NMR del backbone della proteina. La struttura cristallografica di nsp9 da SARS-CoV-2 è stata recentemente pubblicata ma questa, tuttavia, non riduce l'interesse per lo studio della proteina in soluzione poiché questo è il prerequisito per lo screening di frammenti biologicamente attivi e più in generale per la messa a punto di strategie di progettazione di farmaci.

PUBBLICAZIONI

- Altincekic N., Korn S.M., Qureshi N.S., Dujardin M., Ninot-Pedrosa, Abele R., Abi Saad M.J., Alfano C., Monaca E., Sabbatella R., Schlundt A. (2021) Large-scale recombinant production of the SARS-CoV-2 proteome for high-throughput and structural biology applications. *Frontiers in Molecular Biosciences*, Accepted.
- Dudás E.F., Puglisi R., Korn S.M., Alfano C., Bellone M.L., Dal Piaz F., Kelly G., Monaca E., Schlundt A., Schwalbe H., Pastore A. (2021) Backbone chemical shift spectral assignments of SARS coronavirus-2 non-structural protein nsp9. *Biomolecular NMR Assignments*, Accepted.

Covid-19 NMR International Consortium

TEAM Ri.MED: Gruppo di Biologia Strutturale e Biofisica

PARTNERSHIP

- Goethe University di Francoforte
- UK Dementia Research Institute (UK DRI) - King's College London, UK
- Covid19-NMR International Consortium

ABSTRACT

Il progetto Covid19-NMR è stato avviato presso la Goethe University di Francoforte nel marzo scorso e nel giro di un mese è diventato un consorzio internazionale: scienziati di tutto il mondo, uniti dall'emergenza della pandemia tuttora in corso, stanno collaborando ad uno sforzo unico per studiare la SARS-CoV-2 usando la spettroscopia NMR. L'obiettivo generale è unire le forze per raggiungere risultati scientifici il più rapidamente possibile e renderli immediatamente disponibili on-line con aggiornamenti settimanali. L'obiettivo specifico della ricerca è di determinare le strutture in soluzione dell'RNA e delle proteine di SARS-CoV-2 e di effettuare un approccio di ricerca del farmaco basata su frammenti di molecole mediante tecniche NMR. Nell'ambito del Covid19-NMR Consortium, il team di Biologia strutturale e Biofisica della Fondazione Ri.MED si occupa della delucidazione strutturale delle proteine orf8 e nsp9 del virus.

RISULTATI

Nell'ambito del Covid-19 NMR International Consortium, il gruppo di Biologia Strutturale e Biofisica della Fondazione Ri.MED ha contribuito a compilare un compendio di oltre 50 protocolli per la produzione e purificazione di 23 delle 30 proteine di SARS-CoV-2 o loro frammenti. E' stato inoltre effettuata l'assegnazione delle risonanze NMR della proteina nsp9.

PUBBLICAZIONI

- Altincekic N., Korn S.M., Qureshi N.S., Dujardin M., Ninot-Pedrosa, Abele R., Abi Saad M.J., Alfano C., Monaca E., Sabbatella R., Schlundt A. (2021) Large-scale recombinant production of the SARS-CoV-2 proteome for high-throughput and structural biology applications. *Frontiers in Molecular Biosciences*, Accepted.

ADVANCED DATA ANALYSIS E IDENTIFICAZIONE DI TARGET TERAPEUTICI

Covid-19 Lung CT Lesion Segmentation Challenge

TEAM Ri.MED: Gruppo di Advanced Data Analysis

PARTNERSHIP

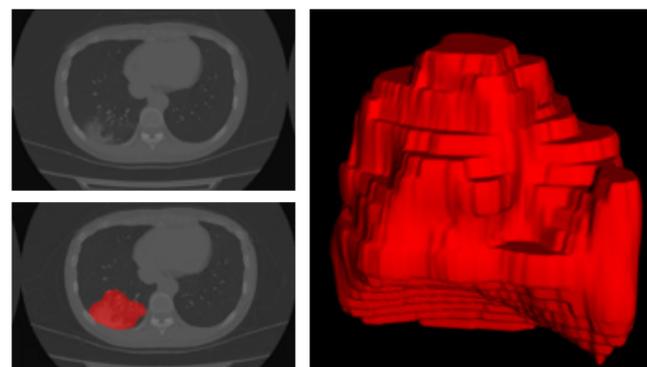
- Istituto di Bioimmagini e Fisiologia Molecolare (IBFM-CNR), Cefalù (PA), Italy.
- Georgia Institute of Technology, Atlanta, USA.

ABSTRACT

Il Gruppo di Advanced Data Analysis ha partecipato al COVID-19 LUNG CT LESION SEGMENTATION CHALLENGE (COVID-19-20), organizzato dalla Medical Image Computing and Computer Assisted Intervention Society. Si è trattato di una sfida internazionale per lo sviluppo di algoritmi di intelligenza artificiale (AI) per la segmentazione e la quantificazione delle lesioni polmonari causate dall'infezione da SARS-CoV-2 da immagini CT multicentrico, multinazionali e provenienti da pazienti di età, sesso e gravità variabile della malattia. I partecipanti - 221, tra cui il nostro Scientist in Nuclear Magnetic Resonance, Dott. Albert Comelli - hanno avuto a disposizione lo stesso data-set di immagini CT senza contrasto del torace di 199 e 50 pazienti, rispettivamente per l'addestramento e la validazione, con RT-PCR positiva per SARS-CoV-2 e annotazioni delle lesioni COVID-19 ai polmoni forniti dal Consorzio multinazionale NIH per CT AI in COVID-19. Trenta giorni di tempo per istruire algoritmi di AI e testarli su un data-set 46 pazienti aggiuntivi con RT-PCR positiva per SARS-CoV-2 e annotazioni delle lesioni COVID-19 nella CT polmonare non visibili ai partecipanti. Il comitato della challenge ha valutato il rendimento degli algoritmi confrontando i loro risultati con le effettive diagnosi.

RISULTATI

L'algoritmo AI istruito dal Gruppo di Advanced Data Analysis della Fondazione Ri.MED si è classificato primo in Italia.



Studio CT del polmone, individuazione della lesione COVID-19, e ricostruzione 3D della lesione COVID-19

Human microRNAs against SARS-CoV-2

TEAM Ri.MED: Gruppo di Advanced Data Analysis e Gruppo di Identificazione Target Terapeutici

PARTNERSHIP

- Dipartimento di Scienze Economiche, Aziendali e Statistiche, UNIPA;
- Department of Computational and Systems Biology, University of Pittsburgh

ABSTRACT

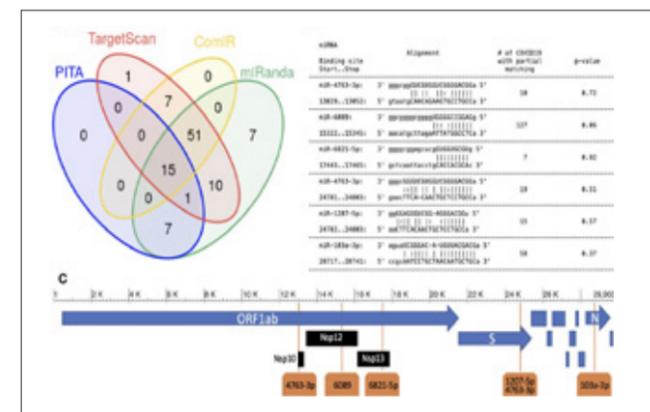
Il progetto si propone di investigare sulle possibili interazioni tra i microRNA espressi nei tessuti polmonari e il virus SARS-CoV-2. Il virus, infettando le cellule, potrebbe interferire con l'intricata rete di interazioni biologiche normalmente esistenti tra microRNA e RNA messenger, "sequestrando" i microRNA coinvolti. In particolare, è stata predetta una forte affinità tra il microRNA miR-1271 - altamente espresso nell'epitelio bronchiale - e una regione del gene SPIKE. Questa interazione, riducendo la disponibilità del miR-1271, potrebbe contribuire all'aumento dell'espressione della proteina Colony Stimulating Factor 1 (CSF1), e quindi potenziare ulteriormente la forte risposta infiammatoria riscontrata nei più gravi casi di COVID-19.

RISULTATI

Selezione di 5 microRNA espressi nei tessuti polmonari in grado di regolare proteine virali e potenzialmente sopprimere la riproduzione del virus.

PUBBLICAZIONI

Bertolazzi Giorgio, Cipollina Chiara, Benos Panayiotis V., Tumminello Michele, Coronello Claudia, miR-1207-5p Can Contribute to Dysregulation of Inflammatory Response in COVID-19 via Targeting SARS-CoV-2 RNA, *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology* 10, 663, (2020); <https://www.frontiersin.org/article/10.3389/fcimb.2020.586592>





SVILUPPO DI NUOVI FARMACI

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

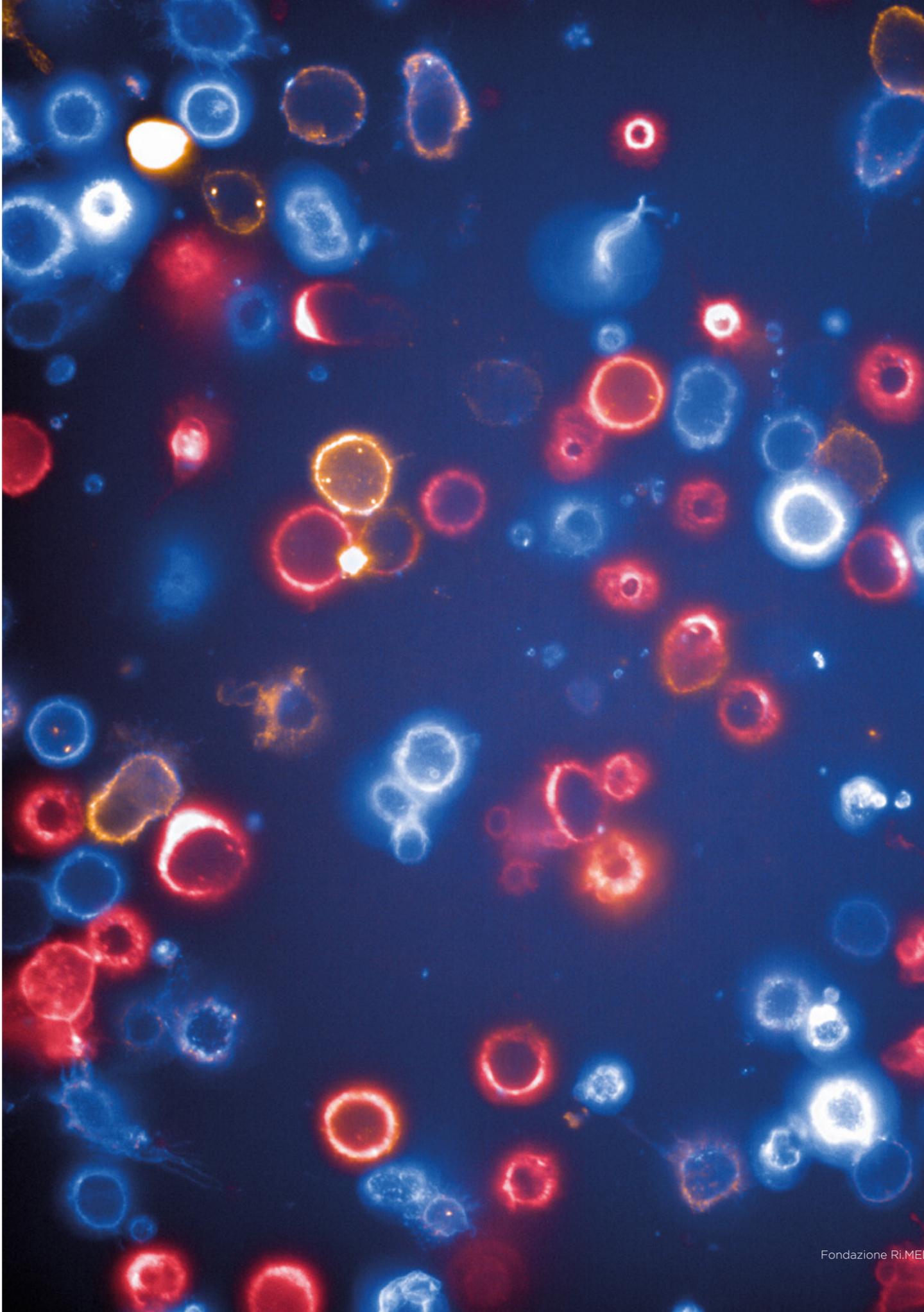
Attraverso lo studio dei *pathway* biomolecolari integrati con dati di genomica, proteomica, metabolica e secretomica, si è arrivati alla validazione funzionale di nuovi target terapeutici per patologie nelle aree terapeutiche di interesse, come per esempio l'oncologia e le malattie dell'invecchiamento.

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

Grazie alla piattaforma integrata di *virtual screening* sono state selezionate, tramite tecniche *structure-based (docking)* e *ligandbased (pharmacophore)*, centinaia di molecole di origine sintetica e naturale.

Lo scorso anno è stata avviata la creazione di una chemoteca che oggi consta di circa 2000 molecole. La procedura prevede che le molecole vengano testate biologicamente: quelle attive, dette *singletons*, vengono validate attraverso studi di QSAR (relazione quantitativa struttura-attività).

Una volta selezionate le serie *hit* più promettenti da un punto di vista di *druggability* si entra in fase di ottimizzazione *hit to lead*. L'obiettivo a medio termine è la selezione della molecola *lead* da sottoporre alla sperimentazione preclinica, quindi la valutazione dell'efficacia tramite studi *in vivo* integrati con *imaging* molecolare e infine la caratterizzazione del profilo farmacocinetico e tossicologico adatto per la sperimentazione clinica su pazienti.



Caratterizzazione strutturale di proteine da SARS-CoV-2

Caterina Alfano, PhD

Meccanismi molecolari delle malattie da *misfolding* proteico

Caterina Alfano, PhD

Studi strutturali per elucidare il meccanismo di oligomerizzazione della proteina nucleofosmina NPM1.

Caterina Alfano, PhD

Studi strutturali e biofisici per sondare l'interazione di KDM4a con potenziali inibitori

Caterina Alfano, PhD

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

Chiara Cipollina, PhD

Sviluppo di algoritmi di IA per l'estrazione e la selezione di caratteristiche radiomiche dalle immagini biomediche

Albert Comelli, PhD

Sviluppo di algoritmi automatici 3D per la segmentazione e la classificazione di immagini biomediche

Albert Comelli, PhD

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

Claudia Coronello, PhD

Progettazione di inibitori non covalenti di NLRP3 nella patologia infiammatoria

Ugo Perricone, PhD

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

Ugo Perricone, PhD

Caratterizzazione strutturale di proteine da SARS-CoV-2

Caterina Alfano, PhD
calfano@fondazionerimed.com



COLLABORAZIONI

- UK Dementia Research Institute (UK DRI) - King's College London, Londra, Regno Unito
- European Brain Research Institute Rita Levi Montalcini (EBRI), Roma, Italia
- Scuola Normale Superiore di Pisa (SNS), Pisa, Italia
- Dipartimento di Medicina Molecolare - Università degli Studi di Pavia, Pavia, Italia
- Covid19-NMR International Consortium



AREA TERAPEUTICA

Malattie infettive

PIPELINE



BREVE DESCRIZIONE

L'infezione da sindrome respiratoria acuta grave da coronavirus 2 (SARS-CoV-2) è già la terza infezione da coronavirus che si è verificata nel terzo millennio. L'epidemia ha colpito la popolazione mondiale per tutto il 2020 ed è ancora in corso. Questa situazione sottolinea l'importanza di acquisire una comprensione profonda dei meccanismi che regolano l'internalizzazione e la riproduzione virale e la necessità di tradurre questa conoscenza in trattamenti. Nell'ambito di un consorzio internazionale (Covid19-NMR) finalizzato alla caratterizzazione mediante NMR delle proteine SARS-CoV-2, ci siamo concentrati sulla proteina non strutturale 9 (nsp9) e sulla proteina accessoria 8 (orf8), entrambe di estrema rilevanza biologica e terapeutica.

Nsp9 è una proteina dimerica legante ssRNA altamente conservata tra i Betacoronavirus ed è coinvolta nel meccanismo di replicazione virale. La delezione di nsp9 in modelli murini impedisce la sintesi di RNA e l'infezione, indicando che nsp9 è fondamentale per la replicazione virale. Orf8 invece sembra essere responsabile dell'evoluzione dei Betacoronavirus e dei loro salti di specie, oltre ad avere un ruolo nel deprimere la risposta dell'ospite. Infatti, orf8 riduce la trascrizione del complesso MHC di classe I, compromettendo l'azione dei linfociti T dell'ospite sulle cellule infette. La validità di orf8 come target terapeutico è ulteriormente confermata dalla ridotta aggressività di SARS-CoV-2 in pazienti infettati da virus con delezione del gene orf8.

IMPATTO

Dallo scoppio della pandemia, la maggior parte degli sforzi è stata investita nello sviluppo di vaccini contro la proteina virale Spike, ma questi sono utilizzabili su individui sani e la loro copertura a lungo termine è ancora sconosciuta. Parallelamente, sono stati isolati numerosi anticorpi neutralizzanti, tutti contro Spike. Tuttavia, considerando la natura mutante di SARS-CoV-2 che riguarda principalmente la regione Spike, l'attività di questi anticorpi non è dimostrata per le varianti del virus. Pertanto, resta essenziale indagare su altre fasi dell'infezione e della replicazione virale.

Noi abbiamo a sviluppare nuove molecole contro proteine diverse da Spike, implementando allo stesso tempo una piattaforma e un flusso di lavoro per un intervento rapido e decisivo in caso di future pandemie di coronavirus. I dati fin qui prodotti su nsp9 e orf8 forniscono il prerequisito per ulteriori studi di NMR volti a identificare frammenti in grado di interferire con la funzione di nsp9 e orf8, prevenendo così la replicazione virale e/o attenuando l'aggressività del virus. I nostri dati sono anche il prerequisito per selezionare e sviluppare nuovi anticorpi neutralizzanti contro queste due proteine.



RISULTATI RAGGIUNTI NEL 2020

Abbiamo eseguito l'assegnazione delle risonanze NMR del backbone della proteina nsp9 (Fig. 1). La struttura cristallografica di nsp9 da SARS-CoV-2 è stata recentemente pubblicata ma questa, tuttavia, non riduce l'interesse per lo studio della proteina in soluzione poiché questo è il prerequisito per lo screening di frammenti biologicamente attivi e più in generale per la messa a punto di strategie di progettazione di farmaci.

Inoltre, come parte di un consorzio internazionale finalizzato allo

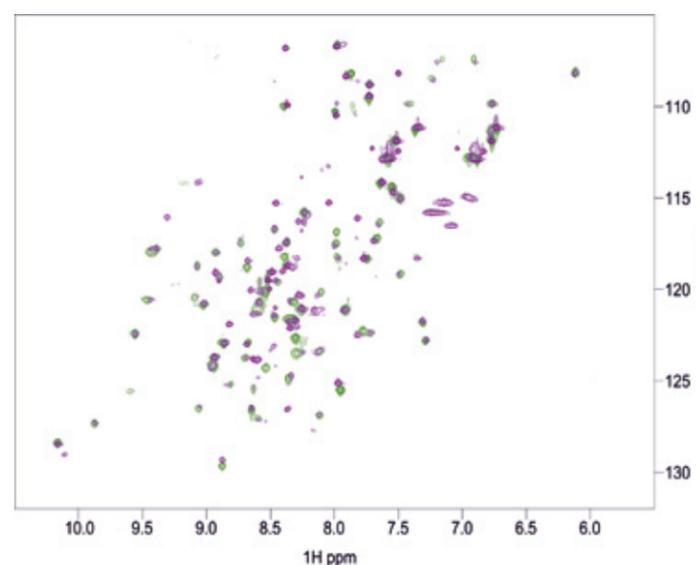


Fig. 1. Confronto degli spettri 2D ¹⁵N HSQC NMR della proteina nsp9 registrati per un campione 100 μM a due condizioni di pH utilizzando uno spettrometro NMR Bruker operante a 800 MHz. Lo spettro in verde è correlato al campione a pH 7.0, mentre lo spettro in viola è correlato al campione a pH 5.0



OBIETTIVI PER IL 2021

Produrremo nsp9 e orf8 ricombinanti per verificare la specificità di anticorpi del tipo single-chain variable fragment (scFv) selezionati dai nostri collaboratori EBRI e SNS. Inoltre, effettueremo studi strutturali e termodinamici su orf8 e nsp9.

Abbiamo già prodotto i cDNA che codificano per orf8 e nsp9 e implementato i protocolli per ottenere quantità pure in mg di campioni. Produrremo quindi le proteine non marcate, per gli studi di stabilità e per i test iniziali di cristallizzazione, e campioni doppiamente marcati ¹⁵N/¹³C per la determinazione della struttura tridimensionale mediante NMR. I campioni marcati verranno utilizzati per acquisire un ampio dataset di esperimenti NMR tridimensionali, utilizzando il nostro spettrometro NMR Bruker operante a 800 MHz e dotato di crio-sonda.

L'assegnazione delle risonanze ed il calcolo strutturale verranno eseguiti automaticamente, utilizzando software dedicati, e convalidati manualmente. Questo permetterà di raggiungere velocemente i nostri obiettivi e aprirà la possibilità a studi sulle interazioni tra le due proteine virali e i scFv selezionati. Quest'ultimi saranno prodotti da EBRI in quantità e purezza tali da consentirci di effettuare studi strutturali e di interazione dei complessi antigene/anticorpo.



PUBBLICAZIONI

- Astoricchio E., Alfano C., Rajendran L., Temussi P., Pastore A. (2020) The Wide World of Coacervates: From the Sea to Neurodegeneration. Trends Biochem Sci, 45(8):706-717.
- Puglisi R., Bryliski O., Alfano C., Martin S.R., Pastore A., Temussi P. (2020) Quantifying the thermodynamics of protein unfolding using 2D NMR spectroscopy. Comm Chemistry, doi: 10.1038/s42004-020-00358-1.
- Altincekic N., Korn S.M., Qureshi N.S., Dujardin M., Ninot-Pedrosa, Abelle R., Abi Saad M.J., Alfano C., Monaca E., Sabbatella R., Schlundt A. (2021) Large-scale recombinant production of the SARS-CoV-2 proteome for high-throughput and structural biology applications. Frontiers in Molecular Biosciences, Accepted.
- Dudás E.F., Puglisi R., Korn S.M., Alfano C., Bellone M.L., Dal Piaz F., Kelly G., Monaca E., Schlundt A., Schwalbe H., Pastore A. (2021) Backbone chemical shift spectral assignments of SARS coronavirus-2 non-structural protein nsp9. Biomolecular NMR Assignments, Accepted.

Meccanismi molecolari delle malattie da misfolding proteico

Caterina Alfano, PhD
calfano@fondazionerimed.com

COLLABORAZIONI

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

AREA TERAPEUTICA

Patologie dell'invecchiamento

PIPELINE



BREVE DESCRIZIONE

Le malattie neurodegenerative sono una minaccia crescente della nostra società moderna sempre più invecchiata. I trattamenti attuali sono nel migliore dei casi palliativi e non specifici, riflettendo il fatto che manca ancora una comprensione dettagliata delle basi molecolari della maggior parte delle malattie neurodegenerative.

La nostra ricerca mira a comprendere i meccanismi molecolari delle malattie da *misfolding* proteico e si basa sul concetto che la conoscenza della funzione fisiologica e della rete di interazione delle proteine aggregogene è uno strumento chiave per progettare mo-

lecole che possono competere in modo specifico con l'aggregazione. Le interazioni native proteina-proteina potrebbero infatti fornire importanti mezzi per alterare e controllare la funzione e l'assemblaggio delle proteine coinvolte nelle malattie neurodegenerative e potrebbero svolgere un ruolo protettivo contro l'aggregazione aberrante.

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

IMPATTO

Il progetto di ricerca affronta domande cruciali sia in biologia strutturale che cellulare, le cui risposte, una volta note, aiuteranno la comprensione dei meccanismi delle malattie neurodegenerative. Le conoscenze acquisite aiuteranno nella progettazione di terapie specifiche e contestualmente forniranno importanti indizi sul fondamentale fenomeno del *folding* e assemblaggio delle proteine.

L'importanza cellulare della proteina scelta come sistema modello, l'atassina-3, è testimoniata dal suo coinvolgimento in malattie che fanno parte della famiglia, in costante aumento, di malattie incurabili causate da *misfolding* e aggregazione proteica, tra cui Alzheimer e Parkinson. In caso di successo, le conoscenze acquisite nel progetto saranno utili molto più in generale per comprendere gli eventi che portano a patologie da *misfolding* proteico e forniranno nuovi strumenti per prevenirle.

RISULTATI RAGGIUNTI NEL 2020

Negli ultimi studi effettuati ci siamo concentrati sull'effetto delle catene di poliubiquitina nella crescita di fibrille del dominio catalitico N-terminale dell'atassina-3, chiamato Josephin. Quest'ultimo, sebbene non contenga il tratto di poliglutammina ed è spazialmente distante da esso, è coinvolto nel *misfolding* ed è l'elemento che determina le proprietà e la morfologia di aggregati di atassina-3.

I nostri risultati hanno confermato la nostra ipotesi che la formazione di aggregati positivi alla tioflavina sia fortemente inibita dalla presenza di catene di poliubiquitine, partner naturali dell'atassina-3 (Fig. 1). Ciò è in accordo con il ruolo

aggregogenico noto di *Josephin* e con l'ipotesi che quando l'atassina-3 è nello stato libero espone superfici situate sul dominio *Josephin* responsabili del legame con l'ubiquitina. La natura idrofobica di queste superfici innesca l'aggregazione e spiega il ruolo di *Josephin* quale centro di nucleazione nel processo di aggregazione anche di atassina-3 intera. I nostri risultati con catene di poliubiquitina dimostrano che l'oscuramento delle suddette superfici idrofobiche su *Josephin*, mediante l'interazione con il suo legante naturale, impedisce l'aggregazione aberrante.

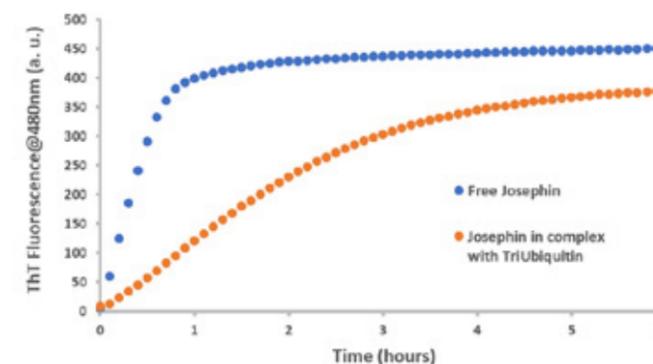


Fig. 1. Evoluzione temporale dell'emissione di fluorescenza della tioflavina a 480 nm relativa a campioni di Josephin libera e Josephin in complesso con una catena di tri-ubiquitina.

OBIETTIVI PER IL 2021

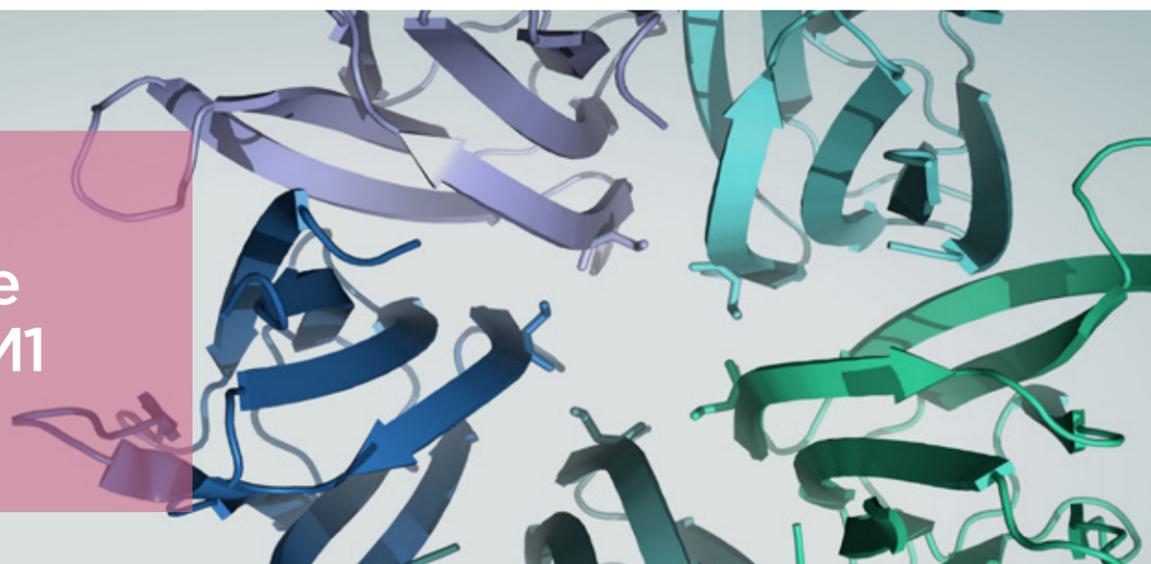
Il nostro obiettivo è una migliore comprensione del ruolo delle interazioni proteina-proteina nell'aggregazione di atassina-3 al fine di utilizzare queste informazioni per progettare farmaci specifici contro l'aggregazione. A tal scopo, verranno determinati i parametri cinetici e termodinamici di complessi atassina-3/catene di poli-ubiquitina e verrà valutato l'effetto delle catene di poli-ubiquitina nell'aggregazione di atassina-3.

PUBBLICAZIONI

- Astoricchio E., **Alfano C.**, Rajendran L., Temussi P., Pastore A. (2020) The Wide World of Coacervates: From the Sea to Neurodegeneration. *Trends Biochem Sci*, 45(8):706-717.
- Puglisi R., Brylski O., **Alfano C.**, Martin S.R., Pastore A., Temussi P. (2020) Quantifying the thermodynamics of protein unfolding using 2D NMR spectroscopy. *Comm Chemistry*, doi: 10.1038/s42004-020-00358-1.
- Fricano A., Vetri V., Vannocci T., Pastore A., **Alfano C.** Role of autocleavage in ataxin-3 aggregation process. Under preparation.

Studi strutturali per elucidare il meccanismo di oligomerizzazione della proteina nucleofosmina NPM1

Caterina Alfano, PhD
calfano@fondazionerimed.com



COLLABORAZIONI

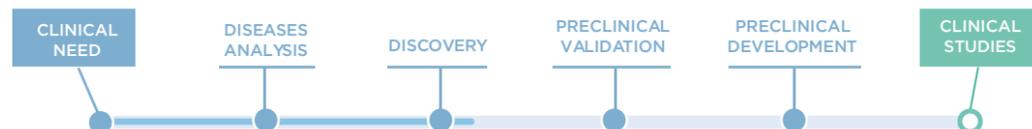
- TES Pharma - Perugia, Italia
- Dipartimento di Medicina, Sezione di Ematologia e Immunologia Clinica - Università degli Studi di Perugia, Perugia, Italia



AREA TERAPEUTICA

Oncologia

PIPELINE



BREVE DESCRIZIONE

Circa un terzo dei pazienti affetti da leucemia mieloide acuta (AML), un cancro aggressivo delle cellule mieloidi, ha un'espressione citoplasmatica aberrante della proteina nucleofosmina (NPM1) dovuta a mutazioni eterozigoti nel dominio C-terminale della proteina stessa. Diverse funzioni sono attribuite a questa fosfoproteina nucleolare altamente abbondante, come la biogenesi del ribosoma, il mantenimento della stabilità del genoma, la risposta allo stress nucleolare e la regolazione dell'apoptosi, e tutte si basano sulla capacità di NPM1 di traslocare tra il nucleolo, il nucleo e il citoplasma. Nei blasti AML, la traslocazione è molto limitata ma ancora funzionante a causa della natura eterozigote delle mutazioni coinvolte e questo permette la soprav-

vivenza delle cellule maligne. L'abolizione della traslocazione di NPM1 potrebbe quindi interferire con la sopravvivenza delle cellule AML. Negli ultimi decenni, sono stati esplorati diversi approcci per compromettere la traslocazione nelle cellule AML cercando di modulare il dominio N-terminale di NPM1 responsabile del processo di oligomerizzazione che porta alla traslocazione. Nonostante questi sforzi, una terapia efficace non è ancora disponibile, probabilmente a causa della mancanza di una comprensione profonda dei meccanismi molecolari alla base del processo di oligomerizzazione di NPM1. Il nostro obiettivo è chiarire questi meccanismi in modo da identificare molecole in grado di compromettere la traslocazione di NPM1 nei blasti AML e interferire con il percorso vitale delle sole cellule maligne.

IMPATTO

La leucemia mieloide acuta è la leucemia acuta più comune negli adulti. I pazienti di età compresa tra 18 e 60 anni affetti da AML possono essere curati usando la chemioterapia convenzionale solo nel 50% dei casi, mentre i pazienti più anziani (> 60 anni) possono essere curati solo in una piccola percentuale (5-10%). La terapia di questa malattia rimane quindi un bisogno medico urgente, in particolare considerando la nostra società moderna sempre più invecchiata. Si prevede che i risultati di progetto ottenuti daranno un contributo cruciale nello sviluppo di nuove strategie terapeutiche mirate alla cura di AML associate a mutazioni di NPM1, risultando in

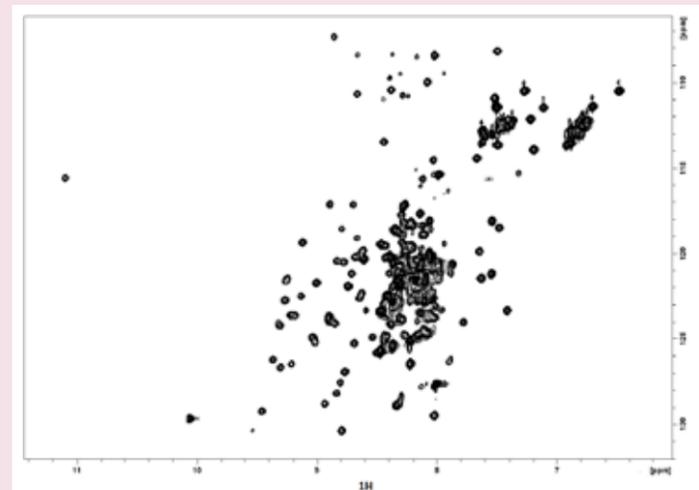


Fig. 1. Spettro NMR 2D ¹⁵N HSQC della proteina NPM1 L18E S88E registrato a 25°C utilizzando uno Spettrometro NMR Bruker operante a 800MHz.



RISULTATI RAGGIUNTI NEL 2020

Per chiarire i meccanismi molecolari dell'oligomerizzazione di NPM1, abbiamo eseguito esperimenti di risonanza magnetica nucleare (NMR), dicroismo circolare (CD) e cromatografia ad esclusione dimensionale combinata con multi-angle light scattering (SEC-MALS) su quattro diversi costrutti del dominio N-terminale di NPM1: 1-130, 1-130 S88E, 1-130 L18A-S88E e L18E-S88E. Attualmente, tutti i nostri risultati evidenziano in modo consistente la presenza di diverse forme oligomeriche per i costrutti 1-130, 1-130 S88E, 1-130 L18A-S88E, confermando la nostra prima ipotesi che un flusso di lavoro di scoperta di piccole molecole biologicamente attive ha alte probabilità di insuccesso se i costrutti suddetti vengono utilizzati nelle fasi sperimentali di screening. Al contrario, i dati NMR e SEC-MALS eseguiti sul mutante L18E S88E rivelano che questo si ripiega come monomero isolato (Fig. 1) e potrebbe quindi essere adatto per uno screening biofisico di frammenti/piccole molecole disegnate per inibire l'oligomerizzazione di NPM1. Una profonda comprensione delle basi molecolari che guidano il processo di oligomerizzazione di NPM1 rimane lontana, ma i nostri risultati permettono un'apertura verso un nuovo *Drug Discovery Program* all'interno di Ri.MED.



OBIETTIVI PER IL 2021

Nostro obiettivo è di determinare la struttura tridimensionale in soluzione di NPM1 L18E-S88E mediante risonanza magnetica nucleare. Questa verrà quindi confrontata con la struttura della subunità monomerica della proteina *wild type* pentamerica. Infatti, la conferma di un'elevata similarità tra le due strutture è cruciale per valutare se il *workflow* Ri.MED per programmi di Drug Discovery può essere applicato al target NPM1.



PUBBLICAZIONI

- Astoricchio E., Alfano C., Rajendran L., Temussi P., Pastore A. (2020) The Wide World of Coacervates: From the Sea to Neurodegeneration. Trends Biochem Sci, 45(8):706-717.
- Puglisi R., Brylski O., Alfano C., Martin S.R., Pastore A., Temussi P. (2020) Quantifying the thermodynamics of protein unfolding using 2D NMR spectroscopy. Comm Chemistry, doi: 10.1038/s42004-020-00358-1.
- Morando M.A., Monaca E., Sabbatella R., Giacchè N., Passeri D., Alfano C. Molecular insights of the oligomerization process of NPM1 N-terminal domain. Under preparation.

PRODOTTI: FARMACI CHIMICI

Studi strutturali e biofisici per sondare l'interazione di KDM4a con potenziali inibitori

Caterina Alfano, PhD
calfano@fondazionerimed.com



COLLABORAZIONI

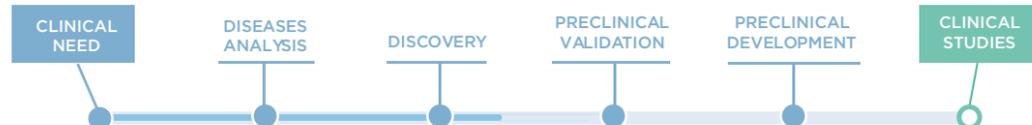
- Dipartimento di Medicina di Precisione - Università della Campania Luigi Vanvitelli, Napoli, Italia.



AREA TERAPEUTICA

Oncologia

PIPELINE



BREVE DESCRIZIONE

Modifiche del DNA e degli istoni sono componenti importanti della regolazione epigenetica e rappresentano un processo essenziale nel controllo della struttura e/o della funzione della cromatina, con modificazioni diverse che producono conseguenze funzionali distinte. Le modifiche post-traslazionali del DNA e degli istoni includono fosforilazione, acetilazione, metilazione, ubiquitinazione e O-GlcNAcilazione. Tra questi, la metilazione è il marker epigenetico più significativo nella regolazione della dinamica della cromatina e può interessare sia il DNA che gli istoni. La metilazione degli istoni coinvolge residui di lisina e arginina, e conta tre forme di metilazione sui residui di lisina (monometile, dimetile e trimetile) e tre forme su arginina (monometilata, e demetilata

simmetrica o asimmetrica). In passato, si pensava che la metilazione degli istoni fosse irreversibile, ma ora è ben noto che può essere invertita dagli enzimi istone lisina demetilasi (KDM), molti dei quali sono deregolamentati in patologie oncologiche. Tra le varie KDM, KDM4a è l'unica in grado di demetilare residui trimetilati e sempre più studi indicano un suo ruolo chiave nell'iniziazione, promozione e progressione di tumori. Nell'ambito dell'Area Drug Discovery della Fondazione Ri.MED, miriamo a identificare composti *leads* in grado di inibire la funzione catalitica di KDM4a. In particolare, abbiamo caratterizzato l'interazione di KDM4a con diversi frammenti e piccole molecole selezionate attraverso un approccio di screening virtuale dal gruppo di Molecular Informatics della Fondazione Ri.MED.



IMPATTO

L'architettura della cromatina è controllata da meccanismi epigenetici come le modificazioni del DNA e degli istoni. Alterazioni aberranti nella struttura della cromatina sono comuni in diversi tipi di tumore, e quindi diversi enzimi coinvolti nelle modificazioni del DNA e degli istoni sono diventati importanti target terapeutici in oncologia. Tra questi target, KDM4a risulta deregolamentato in diversi tipi di cancro, quali il carcinoma della prostata, della vescica, del colon-retto, del polmone, del seno e del cancro a cellule squamose. Non sorprende quindi che ci sia un grande interesse per lo sviluppo di molecole in grado di modulare l'attività demetilasi di KDM4a. Diverse molecole in grado di inibire l'attività di KDM4a sono già state sviluppate ma la maggior parte di esse rimane nella fase pre-clinica perché mancano di selettività e specificità per KDM4a rispetto ad altre demetilasi istoniche, modulando così altri target non desiderati.



RISULTATI RAGGIUNTI NEL 2020

Questo progetto raccoglie uno sforzo interdisciplinare di diversi gruppi di ricerca in Ri.MED. Nel gruppo di Structural Biology and Biophysics, abbiamo ottimizzato l'espressione e la purificazione del dominio catalitico KDM4a ricombinante ed eseguito studi di stabilità mediante risonanza magnetica nucleare e diicroismo circolare (Fig. 1). La tecnologia *Bio-layer Interferometry* è stata utilizzata per determinare la costante di dissociazione (K_D) e i parametri cinetici di legame K_{ass} e K_{diss} per frammenti e piccole molecole selezionate mediante un approccio di screening virtuale dal gruppo di Molecular Informatics della Fondazione Ri.MED. Sono stati inoltre eseguiti esperimenti NMR di *Satura-*



OBIETTIVI PER IL 2021

Il nostro obiettivo è confermare i *primary actives* trovati finora mediante un'analisi approfondita della loro modalità di legame con KDM4a. Alcuni analoghi di questi composti sono già in fase di test. Se confermati, il nostro obiettivo successivo è quello di determinare la struttura tridimensionale dei complessi con KDM4a mediante cristallografia a raggi X. La nostra ambizione è fornire informazioni strutturali sperimentali che possano guidare una migliore progettazione e sintesi di inibitori contro KDM4a in modo da ottenere un *lead compound* in un tempo più breve. Molecole di nuova concezione e sintesi ottenute dai gruppi Molecular Informatic e Medicinal Chemistry verranno testate utilizzando tecniche biofisiche come la risonanza magnetica nucleare e *Bio-layer Interferometry*. Una caratterizzazione strutturale più approfondita verrà eseguita per i composti che mostreranno un'affinità nM per KDM4a.



PUBBLICAZIONI

- Puglisi R., Brylski O., Alfano C., Martin S.R., Pastore A., Temussi P. (2020) Quantifying the thermodynamics of protein unfolding using 2D NMR spectroscopy. *Comm Chemistry*, doi: 10.1038/s42004-020-00358-1.

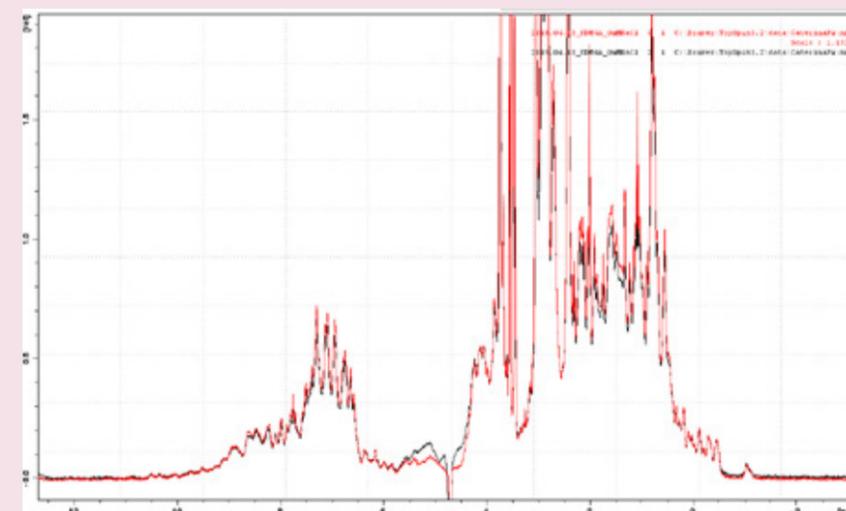


Fig. 1: Spettri NMR 1H monodimensionali di KDM4a in diversi tamponi.

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

Chiara Cipollina, PhD
ccipollina@fondazionerimed.com

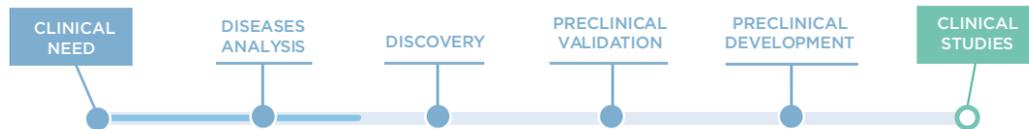
COLLABORAZIONI

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

AREA TERAPEUTICA

Patologie dell'invecchiamento

PIPELINE



BREVE DESCRIZIONE

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

Negli ultimi anni, ci siamo occupati di studiare i meccanismi di disfunzione immunitaria in modelli sperimentali *in vitro/ex vivo* di BPCO in cui il fumo di sigaretta viene utilizzato come stimolo per simulare quello che accade nei polmoni dei pazienti con BPCO. Il nostro obiettivo è di valutare l'ipotesi che l'inflammasoma NLRP3 e i *pathway* ad esso correlati abbiano un ruolo nella patogenesi della BPCO. Il nostro studio, partendo dall'inflammasoma NLRP3 si estende ad altri inflammasomi e al ruolo non apoptotico delle caspasi, al *pathway* dell'interferone β e della Gasdermina D (GSDMD). In parallelo, poiché NLRP3 è un target validato per numerose patologie infiammatorie croniche, in collaborazione con il gruppo di Drug Discovery della Fondazione, stiamo lavorando allo sviluppo di nuovi inibitori selettivi di NLRP3.

IMPATTO

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

RISULTATI RAGGIUNTI NEL 2020

L'utilizzo di modelli sperimentali *in vitro/ex vivo* di infiammazione associata a fumo di sigaretta è in grado di mimare il contesto infiammatorio tipico delle vie aeree di un paziente affetto da BPCO. Lo studio sugli effetti dell'esposizione al fumo di sigaretta in macrofagi umani primari ha rivelato la presenza di un forte sbilanciamento della risposta immunitaria innata. Abbiamo scoperto che il fumo altera profondamente la risposta dei macrofagi all'infezione batterica inibendo l'asse TLR4-MyD88 (con ridotto rilascio di citochine infiammatorie) e contemporaneamente lasciando inalterato l'asse TLR4-TRIF che porta ad attivazione di Caspasi-8/-1 e al rilascio di interferone β . Questo causa uno sbilanciamento della risposta immunitaria che potrebbe spiegare perché l'esposizione al fumo di sigaretta aumenta il rischio di infezione. Sul fronte dei modelli sperimentali innovativi per lo studio di patologie polmonari, uno degli obiettivi raggiunti nel 2020 è stato l'avvio della collaborazione con l'Università di Palermo - Dipartimento di Biomedicina, Neuroscienze e Diagnostica avanzata, Prof. Fabio Bucchieri, il quale ha sviluppato un innovativo modello 3D di unità trofica epitelio-mesenchimale (EMTU) della mucosa bronchiale (Figura 1). Infine, un altro importante obiettivo raggiunto nel 2020 è stata l'approvazione da parte del comitato etico di IRCCS ISMETT dello studio

osservazionale prospettico monocentrico intitolato "Investigating the role of inflammasomes in chronic obstructive pulmonary disease (COPD)" (PI: Dott. Alessandro Bertani).

OBIETTIVI PER IL 2021

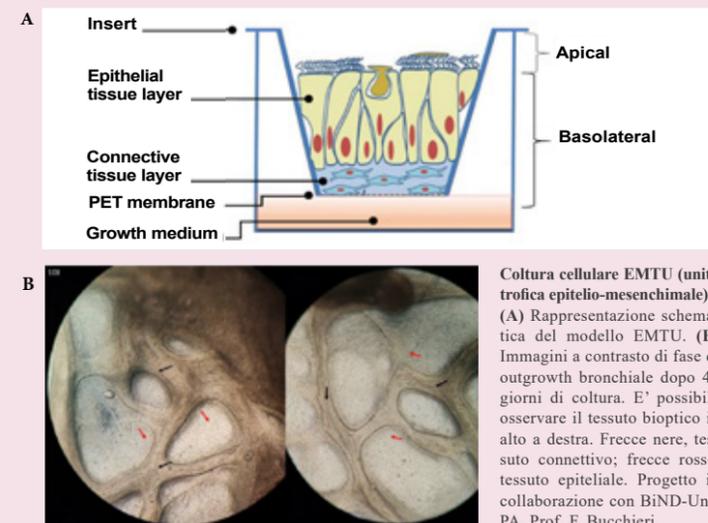
Uno dei principali obiettivi sarà la validazione dei dati fino ad ora ottenuti e la loro espansione in macrofagi alveolari e in campioni di tessuto polmonare isolati da pazienti con BPCO (fumatori ed ex-fumatori) e in gruppi controllo (fumatori e non fumatori) reclutati presso IRCCS ISMETT. Valuteremo inoltre l'attivazione dei *pathway* associati all'inflammasoma NLRP3 nelle cellule strutturali polmonari (epiteliali e fibroblasti) utilizzando il modello 3D EMTU polmonare, colture air-liquid interface e colture primarie. Il conseguimento di questo obiettivo sarà possibile grazie alla collaborazione con IRIB-CNR, IRCCS ISMETT e con l'Università di Palermo - Dipartimento di Biomedicina, Neuroscienze e Diagnostica Avanzata. Questi modelli sperimentali saranno inoltre utilizzati per la messa a punto e validazione di sensori nanostrutturati per lo stress ossidativo in collaborazione con il Dipartimento di Ingegneria dell'Università di Palermo, al fine di perseguire gli obiettivi del progetto Se.N.S.O. (finanziato nell'ambito del programma PO FESR 2014/2020 - Azione 1.1.5). Sul fronte Drug Discovery, l'obiettivo principale sarà la validazione del saggio primario per lo screening di inibitori di NLRP3, a cui farà seguito lo screening con l'identificazione di primary hits e la loro validazione attraverso saggi ortogonali e secondari.

CONFERENZE

- Cigarette Smoke upregulates Notch1 signaling pathway in lung adenocarcinoma". Chiappara G, Sangiorgi C, Di Sano C, D'Anna C, Di Vincenzo S, Zito G, Cipollina C, Bertani A, Vitolo P, Pace E. *European Respiratory Journal* 2020 56: 1974; DOI: 10.1183/13993003.congress-2020.1974.
- Caspase-1 activation by cigarette smoke occurs via TLR4/TRIF/caspase-8 axis leading to metabolic alterations in human macrophages". Buscetta M, Di Vincenzo S, Pace E, Cipollina C. *European Respiratory Journal* 2020 56: 5387; DOI: 10.1183/13993003.congress-2020.5387.

PUBBLICAZIONI

- Electrochemical sensor based on rGO/Au nanoparticles for monitoring H2O2 released by human macrophages". Patella B, Buscetta M, Di Vincenzo S, Ferraro M, Aiello G, Sunseri C, Pace E, Inguanta R, Cipollina C. *Sensors and Actuators, B: Chemical*. Volume 327, 2021, Article number 128901.
- miR-1207-5p Can Contribute to Dysregulation of Inflammatory Response in COVID-19 via Targeting SARS-CoV-2 RNA". Bertolazzi G, Cipollina C, Benos PV, Tumminello M, Coronello C. *Front Cell Infect Microbiol*. 2020, 10:586592. doi: 10.3389/fcimb.2020.586592. PMID: 33194826.
- Cellular Models and Assays to Study NLRP3 Inflammasome Biology". Zito G, Buscetta M, Cimino M, Dino P, Bucchieri F, Cipollina C. *Int J Mol Sci*. 2020, 21(12):4294. doi: 10.3390/ijms21124294. PMID: 32560261.
- Cigarette smoke inhibits the NLRP3 inflammasome and leads to caspase-1 activation via the TLR4-TRIF-caspase-8 axis in human macrophages". Buscetta M, Di Vincenzo S, Miele M, Badami E, Pace E, Cipollina C. *FASEB J*. 2020, 34(1):1819-1832. doi: 10.1096/fj.201901239R. PMID: 31914643.



Sviluppo di algoritmi di IA per la selezione di caratteristiche radiomiche dalle immagini biomediche

Albert Comelli, PhD
acomelli@fondazionerimed.com



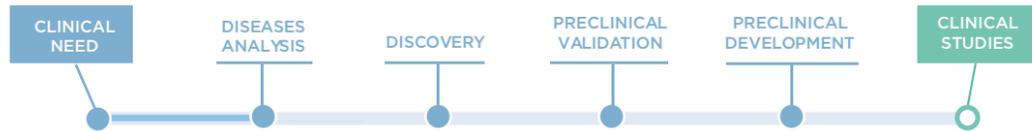
COLLABORAZIONI

- Istituto Mediterraneo per i Trapianti (ISMETT) IRCCS, Palermo, Italia
- Istituto di Bioimmagini e Fisiologia Molecolare (IBFM-CNR), Cefalù, Italia
- Georgia Institute of Technology (GIT), Atlanta, USA
- Unità di Medicina Nucleare, Università di Messina, Messina, Italia
- Dipartimento di Biomedicina, Neuroscienze e Diagnostica avanzata (BIND), University of Palermo, Palermo, Italia
- Unità di Medicina Nucleare, Fondazione Istituto G.Giglio, Cefalù, Italia
- Dipartimento di Ingegneria, Università di Palermo, Palermo, Italia
- Unità di Fisica Medica, Ospedale Cannizzaro, Catania, Italia
- Dipartimento di Medicina Nucleare, Ospedale Cannizzaro, Catania, Italia



AREA TERAPEUTICA Oncologia

PIPELINE



BREVE DESCRIZIONE

La radiomica rappresenta una nuova frontiera della medicina basata sull'estrazione di dati quantitativi dalle immagini biomediche che non possono essere rilevati dall'occhio umano e sull'uso di questi dati per la creazione di sistemi di supporto alle decisioni cliniche. L'obiettivo a lungo termine della radiomica è quello di migliorare la diagnosi non invasiva delle patologie focali e diffuse di vari organi attraverso la comprensione di collegamenti tra i dati di imaging quantitativo e le caratteristiche molecolari e patologiche delle lesioni.

Studi pubblicati nell'ultimo decennio hanno dimostrato l'enorme potenziale della radiomica nella patologia tumorale e non, nell'ambito di diversi sistemi e apparati inclusi encefalo, polmone, mammella, apparato gastrointestinale e genitourinario. L'enorme potenziale della radiomica deve essere però guidato dal rigore metodologico proprio della ricerca scientifica e dall'integrazione dei dati radiologici con le altre branche della medicina, al fine di migliorare la gestione personalizzata del paziente.

IMPATTO

La radiomica viene utilizzata per migliorare la previsione della sopravvivenza globale e/o della risposta alla terapia del paziente, identificando modelli predittivi e/o prognostici personalizzati a supporto del processo decisionale medico. La segmentazione del target, l'estrazione delle caratteristiche, la selezione delle caratteristiche e il modello di classificazione sono i blocchi fondamentali di un flusso di lavoro radiomico. Il progetto propone un nuovo flusso di lavoro radiomico per identificare un modello prognostico rilevante riguardante un problema clinico reale. Nello specifico, proponiamo un sistema di segmentazione indipendente dall'operatore con la conseguente estrazione automatica delle caratteristiche radiomiche e un nuovo approccio di selezione delle caratteristiche per creare un modello predittivo rilevante nei pazienti sottoposti a diversi metodi di imaging come la risonanza magnetica, la tomografia computerizzata e la tomografia a emissione di positroni.



RISULTATI RAGGIUNTI NEL 2020

Il progetto ha contribuito a:

- Indagare la potenziale applicazione dell'analisi della trama delle immagini Cho-PET / TC nel cancro alla prostata e proporre un sistema che incorpori un nuovo modello radiomico ad apprendimento automatico per selezionare le caratteristiche di imaging PET in grado di prevedere la progressione della malattia nel cancro alla prostata (PCa) in pazienti con stessa classe di rischio al momento della radioterapia;
- Ottenere il volume biologico del tumore (BTV) delle metastasi cerebrali in pazienti sottoposti a PET con metionina (11C-MET), utilizzando una procedura completamente automatica e utilizzare questi BTV per estrarre le caratteristiche radiomiche per stratificare i pazienti che rispondono al trattamento o no;
- Migliorare la previsione della sopravvivenza globale del paziente e/o degli esiti in 46 pazienti con lesione prostatica sottoposti a risonanza magnetica per immagini.

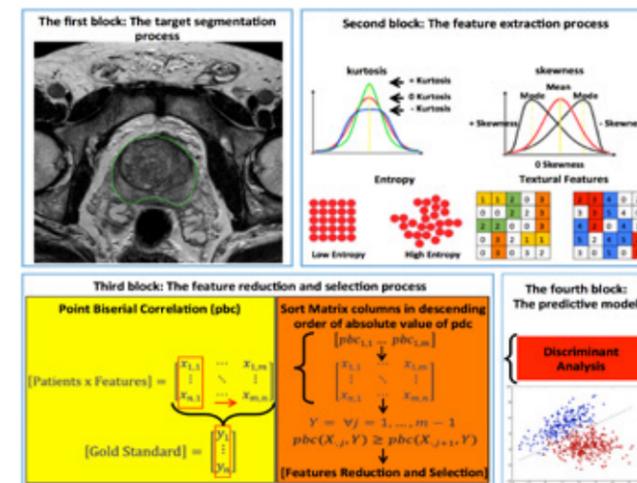


Figura 1. Il sistema di radiomica proposto. I) L'algoritmo di segmentazione basato sul contorno attivo migliorato; II) Il software di analisi delle texture MaZda per estrarre le caratteristiche radiomiche per ogni paziente; III) Un nuovo approccio sequenziale misto descrittivo-inferenziale per identificare le caratteristiche più discriminanti che riducono la ridondanza; IV) Il modello di previsione basato sull'analisi discriminante.



OBIETTIVI PER IL 2021

Durante il 2021, miriamo a sviluppare una nuova matrice radiomica 3D. Questa nuova matrice radiomica 3D dovrà caratterizzare le lesioni tumorali dal tessuto sano. Faremo affidamento sull'esperienza maturata nella segmentazione delle lesioni e nell'estrazione, selezione e riduzione dei descrittori radiomici per la classificazione dei tessuti e il supporto alla diagnosi. Questa matrice sarà completamente 3D e assumerà una forma sferica per renderla totalmente inalterata rispetto al posizionamento spaziale. Utilizzeremo i nostri lavori precedenti per confrontare e testare la nuova matrice su dataset già utilizzati con matrici radiomiche di ultima generazione. Il nostro obiettivo sarà quello di generare una nuova matrice radiomica che sfrutti i vantaggi del 3D per l'estrazione e la combinazione di caratteristiche in grado di supportare diagnosi mediche di precisione.



CONFERENZE

24rd Conference on Medical Image Understanding and Analysis, July, 2020, Oxford (UK).



PUBBLICAZIONI

- Comelli A, Stefano A, Coronello C, Russo G, Vernuccio F, Cannella R, Salvaggio G, Lagalla R, Barone S (2020). Radiomics: A New Biomedical Workflow to Create a Predictive Model. In: Papież B., Namburete A., Yaqub M., Noble J., Medical Image Understanding and Analysis. COMMUNICATIONS IN COMPUTER AND INFORMATION SCIENCE, vol. 1248, p. 280-293, ISBN: 978-3-030-52790-7, ISSN: 1865-0929, doi: 10.1007/978-3-030-52791-4_22
- Stefano A, Comelli A, Bravatà V, Barone S, Daskalovski I, Savoca G, Sabini M G, Ippolito M, Russo G (2020). A preliminary PET radiomics study of brain metastases using a fully automatic segmentation method. BMC BIOINFORMATICS, vol. 21, 325, ISSN: 1471-2105, doi: 10.1186/s12859-020-03647-7
- Alongi P, Stefano A, Comelli A, Laudicella R, Arnone G, Barone S, Midiri M and Russo G. (2020). 18F-Choline PET/CT in the evaluation of high-risk prostate cancer outcome: an explorative study on radiomics feature classification for prediction of disease progression. In EUROPEAN JOURNAL OF NUCLEAR MEDICINE AND MOLECULAR IMAGING (Vol. 47, No. SUPPL 1, pp. S175-S175). ONE NEW YORK PLAZA, SUITE 4600, NEW YORK, NY, UNITED STATES: SPRINGER. In Press.
- Vernuccio F, Cannella R, Comelli A, Salvaggio G, Lagalla R, Midiri M. (2020). Radiomics and artificial intelligence: New frontiers in medicine. RECENTI PROGRESSI IN MEDICINA, vol. 111, p. 130-135, ISSN: 0034- 1193, doi: 10.1701/3315.32853
- Stefano A, Gioe M, Russo G, Palmucci S, Torrisi S.E, Bignardi S, Basile A, Comelli A, Benfante V, Sambataro G, Falsaperla D, Torcitto A.G, Attanasio M, Yezzi A, Vancheri C. (2020). Performance of radiomics features in the quantification of idiopathic pulmonary fibrosis from HRCT. DIAGNOSTICS, vol. 10, diagnostics10050306, ISSN: 2075-4418, doi: 10.3390/diagnostics10050306

Sviluppo di algoritmi automatici 3D per la segmentazione e la classificazione di immagini biomediche

Albert Comelli, PhD
acomelli@fondazionerimed.com



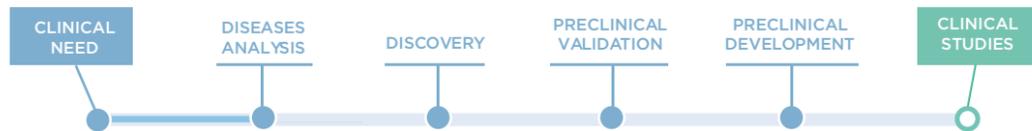
COLLABORAZIONI

- Istituto Mediterraneo per i Trapianti (ISMETT) IRCCS, Palermo, Italia
- Istituto di Bioimmagini e Fisiologia Molecolare (IBFM-CNR), Cefalù, Italia
- Georgia Institute of Technology (GIT), Atlanta, USA
- Unità di Medicina Nucleare, Università di Messina, Messina, Italia
- Unità di Medicina Nucleare, Fondazione Istituto G.Giglio, Cefalù, Italia
- Dipartimento di Ingegneria, Università di Palermo, Palermo, Italia
- Unità di Fisica Medica, Ospedale Cannizzaro, Catania, Italia
- Dipartimento di Medicina Nucleare, Ospedale Cannizzaro, Catania, Italia



AREA TERAPEUTICA Oncologia

PIPELINE



BREVE DESCRIZIONE

Nel campo dell'imaging biomedico, la segmentazione del target viene abitualmente utilizzata come primo passo in qualsiasi sistema automatizzato di diagnosi delle malattie (o sistema di radioterapia) e, negli ultimi anni, negli studi di radiomica per ottenere grandi volumi di dati quantitativi da immagini mediche.

Questi dati vengono quindi utilizzati come biomarcatori di imaging per identificare qualsiasi possibile associazione con l'esito del paziente. Il primo passo di un flusso di lavoro radiomico è la delineazione del target (es. Tumore o organo)

in modo tale da evitare distorsioni nell'estrazione dei parametri. Sebbene la delineazione manuale sembri il modo più intuitivo e facilmente implementabile per ottenere il volume target, è un processo che richiede tempo ed è soggetto alla massima variabilità inter e intra-osservatore.

Questa variabilità causa risultati irripetibili nella firma radiomica che è fortemente influenzata dalla regione di interesse disegnata per identificare il tumore. Per questo motivo, è obbligatorio un metodo di delineazione degli obiettivi automatico e indipendente dall'operatore.

IMPATTO

Il processo di segmentazione rimane un'area di ricerca popolare e stimolante. Oggigiorno l'attività clinica pone un elevato livello di domanda su algoritmi di segmentazione, necessari per produrre risultati ripetibili, indipendenti dalle scelte compiute dall'utente e capaci di elaborare in tempo reale. Il progetto propone un sistema di segmentazione appositamente ingegnerizzato per raggiungere il massimo livello di automazione e in grado di ottenere una segmentazione indipendente dall'operatore. Nello specifico, proponiamo due metodologie:

- Una superficie attiva (AS) completamente 3D guidata da un componente di apprendimento automatico 3D (ovvero classificazione dei tessuti 3D) per la segmentazione dei tumori nei distretti polmonari, della testa e del collo e del cervello in PET.
- Un *framework* di apprendimento profondo per la segmentazione dell'aorta aneurismatica e della sua valvola ma anche del parenchima con fibrosi polmonare idiopatica che fornisce risultati di segmentazione rapidi e precisi dopo essere stati addestrati con un set piccolo di immagini di CT ad alta risoluzione.



RISULTATI RAGGIUNTI NEL 2020

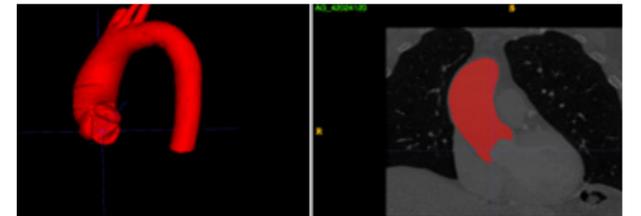
Il progetto ha contribuito a:

- Identificare un approccio di segmentazione *deep learning* automatico, accurato e veloce, applicato al parenchima, utilizzando un dataset molto piccolo di immagini di tomografia computerizzata ad alta risoluzione di pazienti con fibrosi polmonare idiopatica;
- Progettare algoritmi di segmentazione efficienti e indipendenti dall'operatore in grado di ricostruire la forma tridimensionale (3D) del tumore per diagnosi accurate e pianificazione del trattamento radioterapico;
- Dimostrare che i modelli di apprendimento profondo possono segmentare e quantificare rapidamente la geometria 3D dell'aneurisma dell'aorta toracica ascendente (ATAA) con elevata precisione, facilitando così l'espansione nel flusso di lavoro clinico dell'approccio personalizzato alla gestione dei pazienti con ATAA.



OBIETTIVI PER IL 2021

Per il 2021 l'obiettivo principale sarà quello di sviluppare nuovi metodi di segmentazione 3D ibridati. Questi nuovi metodi saranno ispirati da algoritmi di segmentazione del contorno attivo locale guidati da algoritmi di intelligenza artificiale come le reti naturali di convoluzione. Un modello di *deep learning*, formato da esempi forniti da operatori umani esperti, è in grado di etichettare i tessuti in due o più categorie come: lesione/organo e *background*. Questo metodo è coerente e veloce per riprodurre lo stesso risultato ogni volta e incorpora parte della conoscenza del trainer nel processo di guida del processo di segmentazione del contorno attivo locale. Il nostro scopo sarà quello di ibridare il meglio dei due metodi per ottenere un algoritmo di segmentazione automatica, indipendente dall'operatore e dal metodo di acquisizione.



Segmentazione 3D dell'aorta ascendente aneurismatica realizzata attraverso modelli di Deep learning.



CONFERENZE

24rd Conference on Medical Image Understanding and Analysis, July, 2020, Oxford (UK)



PUBBLICAZIONI

- Comelli A (2020). Fully 3D Active Surface with Machine Learning for PET Image Segmentation. JOURNAL OF IMAGING, vol. 6, p. 113-125, ISSN: 2313-433X, doi: 10.3390/jimaging6110113
- Comelli A, Coronello C, Dahiya N, Benfante V, Palmucci S, Basile A, Vancheri C, Russo G, Yezzi A and Stefano A. Lung Segmentation on High-Resolution Computerized Tomography Images Using Deep Learning: A Preliminary Step for Radiomics Studies. J. Imaging 2020, 6, 125.
- Comelli A, Dahiya N, Stefano A, Benfante V, Gentile G, Agnese V, Raffa G M, Pilato M, Yezzi Y, Petrucci G, Pasta S (2020). Deep Learning Approach for the Segmentation of Aneurysmal Ascending Aorta. BIOMEDICAL ENGINEERING LETTERS, ISSN: 2093-9868, doi: 10.1007/s13534-020-00179-0
- Comelli A, Bignardi S, Stefano A, Russo G, Sabini M G, Ippolito M, Yezzi A (2020). Development of a new fully three dimensional methodology for tumours delineation in functional images. COMPUTERS IN BIOLOGY AND MEDICINE, vol. 120, 103701, ISSN: 0010-4825, doi: 10.1016/j.combiomed.2020.103701
- Laudicella R, Comelli A, Stefano A, Szostek M, Crocè L, Vento A, Spataro A, Comis A.D, La Torre F, Gaeta M, Baldari S and Alongi P.(2020). Artificial Neural Networks in Cardiovascular Diseases and its Potential for Clinical Application in Molecular Imaging. Current Radiopharmaceuticals, doi: 10.2174/1874471013666200621191259

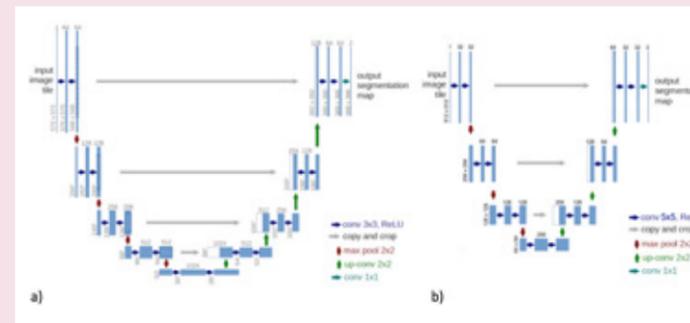


Figura 1. Confronto tra l'architettura UNet originale (a) e la nostra implementazione UNET (b). Ciascun riquadro blu è una mappa delle funzionalità multicanale con il numero di canali indicato nella parte superiore del riquadro. La dimensione x-y è indicata sul bordo inferiore sinistro del riquadro. Le caselle bianche rappresentano le funzionalità a bassa risoluzione copiate.

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

Claudia Coronello, PhD
ccoronello@fondazionerimed.com

COLLABORAZIONI

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

AREA TERAPEUTICA

Oncologia - Malattie infettive

PIPELINE



BREVE DESCRIZIONE

I microRNA sono piccoli filamenti di RNA con l'importante funzione di regolare l'espressione genica dei loro target, tra i quali compaiono gli RNA messaggeri (mRNA) codificanti per proteine. Ad oggi sono stati riconosciuti circa 2.000 microRNA e ciascuno di essi regola l'espressione di migliaia di target. Poiché il genoma umano comprende circa 20.000 geni codificanti per proteine, ci troviamo di fronte a una fitta e complessa rete di interazioni, chiamato mirnoma. Lo scenario è in più complicato dal fatto che ciascun tessuto cellulare possiede uno specifico profilo di espressione genica, per cui la rete di interazioni che effettivamente si manifesta è diversa in ciascun tessuto. In questo progetto, ci proponiamo

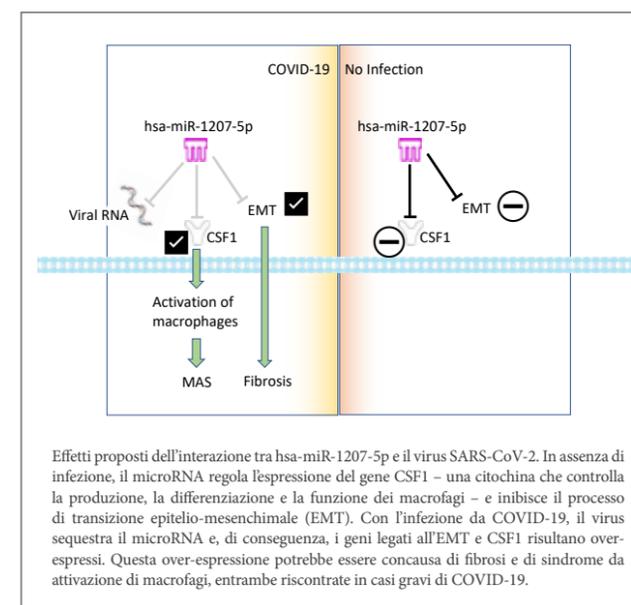
di modellizzare la rete di interazione specifica di un qualsiasi tessuto cellulare, focalizzando lo studio su tessuti tumorali per individuare le anomalie sulla rete di interazioni rispetto ai rispettivi tessuti sani. I profili di espressione di microRNA e mRNA utili a modellizzare la rete di interazione specifica di un tessuto possono essere ricavati attraverso tecniche high throughput data analysis, come ad esempio le tecnologie basate su *microarray* o NGS. Con le suddette tecnologie è possibile misurare simultaneamente i livelli di espressione dei 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

Richissime sono oggi le banche dati che rendono pubblicamente accessibili Big Data biologici. Infatti, è apprezzata e incentivata la condivisione dei dati utilizzati per ottenere i risultati descritti nelle riviste scientifiche internazionali.

Ad esempio, i profili di espressione genica, sono depositati in banche dati come *Gene Expression Omnibus* o *ArrayExpress*. Chiunque sia interessato ad un particolare tessuto cellulare avrà già a disposizione un corredo di profili di espressione da studi già pubblicati. Tali dati offrono informazione sull'espressione dell'intero genoma nei tessuti di interesse e vengono soprattutto utilizzati per eseguire un primo screening e individuare su quali marcatori focalizzare la ricerca.

A fronte di una enorme mole di dati disponibili, ciò che manca sono algoritmi di analisi di dati in grado integrare più fonti di *Big Data*. Mentre sono ormai consolidati algoritmi utili ad individuare i geni o i microRNA differenzialmente espressi tra due tipologie di tessuto cellulare, utili per individuare le anomalie nei profili di espressione di microRNA e di mRNA, non esiste ad oggi alcun metodo per individuare quali anomalie si ripercuotono sulle interazioni tra microRNA e i mRNA. Lo sviluppo di tali metodi porterà nuovi strumenti per la comprensione delle cause di patologie come il cancro, arricchendo la ricerca di "quali sono i geni" con l'informazione su "quali sono le interazioni" coinvolte nella patologia.



RISULTATI RAGGIUNTI NEL 2020

Nel 2020 ci siamo dedicati all'aggiornamento del web-tool ComiR, uno strumento capace di predire i target di un set di microRNA, corredati della loro espressione nel tessuto di interesse. Allo stato attuale, ComiR utilizza i siti di legame tra microRNA e mRNA

computazionalmente predetti nella regione del 3'UTR. Abbiamo scoperto che, considerando anche i siti di legame predetti nella regione codificante del mRNA, i risultati prodotti da ComiR sono più attendibili e coerenti con quanto rilevato sperimentalmente. La validazione del nuovo algoritmo è stata condotta utilizzando un dataset di esperimenti in *D. Melanogaster* e ci stiamo occupando di realizzare un dataset analogo utilizzando linee cellulari umane. L'algoritmo è stato utilizzato per predire l'esistenza di siti di legame dei microRNA umani sulla sequenza del virus SARS-CoV-2. È stata predetta una interessante interazione, probabilmente coinvolta nel processo di infiammazione, tra SARS-CoV-2 e la porzione di RNA codificante per la proteina SPIKE.

OBIETTIVI PER IL 2021

Nel 2021 ci proponiamo di sviluppare un algoritmo capace di ricostruire il network di interazioni tra microRNA e mRNA. A ciascuna coppia microRNA-mRNA sarà associato un p-valore basato sull'analisi integrata dei loro profili di espressione.

La principale difficoltà consiste nel fatto che non esiste una tecnica sperimentale in grado di validare tutte le interazioni tra microRNA e RNA messaggero esistenti in un tessuto, ed è pertanto impossibile fare una validazione diretta dei network di interazione predetti. Per proseguire con la validazione, quindi, useremo il network ricavato attraverso questo algoritmo come informazione aggiuntiva per la versione aggiornata di ComiR. Ad oggi, ComiR utilizza in input il profilo di espressione dei microRNA e ne predice i target. La nuova versione di ComiR sfrutterà anche il profilo di espressione di RNA messaggero, utilizzando per calcolare il network di interazione con il nostro algoritmo.

Ci aspettiamo di migliorare le predizioni di target ottenute dalla versione originale di ComiR, in primo luogo perché ci limiteremo a considerare solo i geni effettivamente espressi nel tessuto in esame. In secondo luogo, anche le interazioni microRNA - RNA messaggero saranno limitate a quelle predette come funzionali dal nostro algoritmo, e confidiamo di dimostrare e validare la sua efficacia riscontrando un ulteriore aumento di performance nell'individuazione dei target.

PUBBLICAZIONI

- Bertolazzi, G, Cipollina, C, Benos, PV, Tumminello, M, Coronello, C. (2020). miR-1207-5p Can Contribute to Dysregulation of Inflammatory Response in COVID-19 via Targeting SARS-CoV-2 RNA. *Frontiers in cellular and infection microbiology*, 10. 673-681. doi.org/10.3389/fcimb.2020.586592
- Bertolazzi, G, Benos, PV, Tumminello M, Coronello C (2020) An improvement of ComiR algorithm for microRNA target prediction by exploiting coding region sequences of mRNAs, *BMC Bioinformatics*, 21 (8), 1-10. doi.org/10.1186/s12859-020-3519-5

Progettazione di inibitori non covalenti di NLRP3 nella patologia infiammatoria

Ugo Perricone, PhD
uperricone@fondazionerimed.com



COLLABORAZIONI

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



AREA TERAPEUTICA

Patologie dell'invecchiamento

PIPELINE



BREVE DESCRIZIONE

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

e artrite reumatoide. Evidenze precliniche supportano il fatto che l'inibizione di NLRP3 può ripristinare il fenotipo fisiologico in diversi modelli patologici, con una ridotta compromissione delle difese immunitarie dell'ospite. Pertanto, NLRP3 rappresenta un target farmacologico attraente. Di recente, molti gruppi di ricerca si sono concentrati sullo sviluppo di modulatori selettivi dell'inflammasoma NLRP3, molecole cioè che non interferiscano con l'attività protettiva di altri tipi di inflammasoma. Tuttavia, la mancanza di informazioni strutturali sulla proteina e un meccanismo molecolare poco chiaro dei pochi inibitori noti ostacola il compito di progettare nuovi modulatori selettivi.



IMPATTO

Le patologie legate ad infiammazione cronica sono in grande aumento nel mondo occidentale nell'ultimo decennio e ad oggi non tutti i meccanismi molecolari alla base di tali patologie non sono stati chiariti dalla comunità scientifica. I farmaci attualmente utilizzati come antinfiammatori possono essere utilizzati per smorzare la risposta immunitaria coinvolta nell'insorgenza dell'infiammazione cronica, sopprimendo i sintomi dell'infiammazione, ma con una rara remissione completa della malattia.

La farmacologia dell'infiammazione cronica si concentra principalmente su quattro gruppi di farmaci antinfiammatori: gli inibitori delle prostaglandine (FANS), i glucocorticoidi (GC), i farmaci che modificano la malattia (ad. Es Methotrexate e Sulfasalazina) e agenti bloccanti le citochine infiammatorie. La maggior parte delle terapie attuali agiscono sul sistema immunitario nel tenta-

tivo di inibire la produzione di mediatori chimici pro-infiammatori, senza però risolvere le cause della patologia. Questo progetto si pone l'obiettivo di elucidare i meccanismi molecolari alla base dell'attivazione del complesso NLRP3 e di progettare degli inibitori selettivi non covalenti e non ATP-competitors così da agire sul processo che sta alla base della patologia infiammatoria mediata da NLRP3.



RISULTATI RAGGIUNTI NEL 2020

Nel 2020, il gruppo di Molecular Informatics ha sviluppato due approcci computazionali finalizzati al disegno razionale di modulatori dell'inflammasoma NLRP3. In particolare, il primo approccio riguarda l'inibizione del dominio NACHT della proteina NLRP3 attraverso un meccanismo non competitivo con ATP e con binding non covalente. Il Secondo approccio invece riguarda la progettazione di inibitori proteina-proteina (PPI) che agiscono a livello del dominio PYD di NLRP3 impedendone il legame con il partner proteico ASC che porterebbe al reclutamento di procaspasi 1 e alla conseguente attivazione del complesso responsabile della cascata dell'inflammasoma.

La principale difficoltà legata alla progettazione di molecole attive su questa proteina è legata alla assenza o alla limitata disponibilità di dati strutturali, motivo per cui è stato necessario cercare un modello di omologia della proteina e ottimizzare l'unica struttura risolta al cryo-EM disponibile.

L'uso di avanzate tecniche di *homology modeling* e di *threading* ibrido, hanno ad oggi permesso di ottenere un modello affidabile su cui basare le campagne di *virtual screening* per la selezione di composti da testare su saggio funzionale primario e ortogonale. Le campagne di *virtual screening* hanno permesso l'acquisizione di una libreria di 500 molecole da testare su NLRP3.

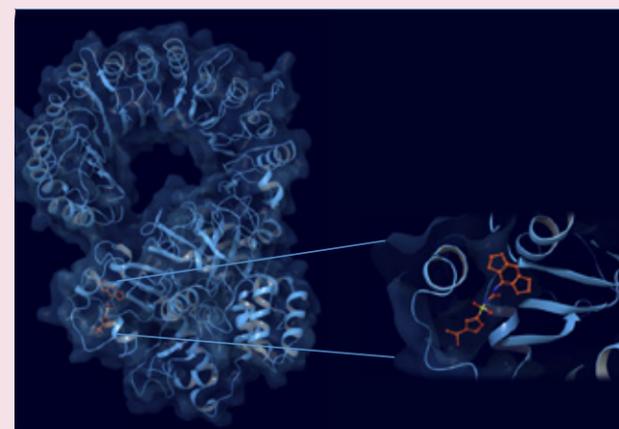


OBIETTIVI PER IL 2021

Nel 2021 l'obiettivo sarà quello di effettuare i saggi biologici sulle 500 molecole acquisite nel 2020 e attraverso approcci di progettazione congiunta con il gruppo di chimica medicinale, trovare almeno due hit families (una per ogni approccio considerato) che abbiano attività biologica inferiore a 10 μ M confermata nei saggi primari e in quelli ortogonali.

Al fine di ottenere delle famiglie di *hit compounds*, si partirà dai *singleton* ritrovati nello screening e che presentino le caratteristiche chimiche adeguate per ampliare e confermare le attività riscontrate. L'espansione di una serie consentirà inoltre un primo studio della SAR con conseguente avvio di strategie sintetiche mirate alla massimizzazione della potenza e all'ottimizzazione del profilo ADMET delle molecole progettate.

Oltre allo screening virtuale di *small molecules* e peptidomimetici (nel caso degli inibitori del dominio PYD), si procederà anche con l'analisi di librerie di frammenti al fine di esplorare al meglio gli *hot spot* presenti sulla superficie della proteina.



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

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

Ugo Perricone, PhD
uperricone@fondazionerimed.com

COLLABORAZIONI

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

AREA TERAPEUTICA

Oncologia

PIPELINE



BREVE DESCRIZIONE

I processi epigenetici sono meccanismi essenziali nel funzionamento fisiologico dei modelli di espressione genica cellulari. I cambiamenti globali nello scenario epigenetico sono infatti segnali distintivi dell'iniziazione e progressione del cancro. L'N-Metilazione dei residui lisina e arginina è uno dei più frequenti meccanismi di regolazione epigenetica trascrizionale negli eucarioti. Nell'uomo sono due le famiglie di enzimi che catalizzano la demetilazione dei residui lisinici (KDMs). La famiglia delle KDM2-7 è la più grande classe di demetilasi, è costituita da 20 enzimi. In particolare modo, KDM4A è frequentemente amplificato e overespresso in diversi tipi di tumori umani, ad esempio nel cancro alle ovaie, al colon o nel carcinoma a cel-

lule squamose. L'obiettivo principale del progetto di ricerca è la progettazione razionale e la sintesi di *small molecules* in grado di modulare i meccanismi epigenetici regolati dalla Istone lisina demetilasi 4 (KDM4) alla base delle patologie tumorali. Il disegno razionale delle molecole prevede diversi approcci tra cui la creazione di modelli *in Silico* creati sulle proteine target, oggetto del nostro studio, e la loro validazione in modo retrospettivo. Questi modelli vengono utilizzati per il *virtual screening* e il *molecular modeling* al fine di identificare potenziali *hit compounds*, attraverso tecniche computazionali e guidare la sintesi chimica verso composti che passano da un profilo di *hit compound* a uno di *lead compound*.

IMPATTO

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

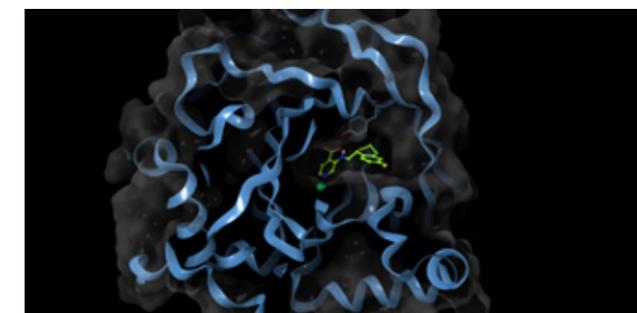
RISULTATI RAGGIUNTI NEL 2020

Durante il 2020 sono stati ottimizzati i modelli computazionali che potessero servire per la progettazione razionale di molecole ad attività inibitoria sul target. In particolare ci si è concentrati sull'utilizzo di algoritmi di *docking* molecolare, farmacofori structure- e ligand-based e approcci chemoinformatici basati sull'utilizzo di fingerprint molecolari. La validazione retrospettiva dei modelli computazionali e la loro applicazione nelle campagne di *virtual screening* su librerie di frammenti commerciali ha permesso l'identificazione di *hit compounds* che sui saggi bio-

chimici preliminari hanno mostrato attività μM su KDM4. Le stesse molecole sono state saggiate con tecniche biofisiche (BLI) e hanno mostrato dati di K_d nel range μM . Sulla base dei risultati ottenuti dagli screening, si è passati alla conferma delle *hit series* attraverso la selezione di analoghi e alla progettazione di nuove strutture, basandosi anche su sostituzioni isosteriche con l'obiettivo di migliorarne il profilo di attività delle molecole trovate in fase di screening.

OBIETTIVI PER IL 2021

Per il 2021 l'obiettivo principale è la progettazione e la sintesi di molecole analoghe delle *hit* preliminari trovate nel 2020 al fine di migliorarne la potenza e il profilo di tossicità. Inoltre verranno condotte nuove campagne di *virtual screening* e di progettazione congiunta col team di chimica medicinale, con l'obiettivo di trovare nuove molecole con *scaffold* di nuova progettazione, che mostrino un'attività apprezzabile. In particolare, si svilupperanno almeno due *hit families* al fine di poter effettuare un'analisi SAR finalizzata ad ulteriori processi di miglioramento della struttura chimica. Il passaggio successivo, ad oggi previsto per la fine del 2021, è la progettazione di un *lead compound*. L'attività delle molecole sarà valutata sia dal punto di vista biologico con saggi enzimatici e saggi cellulari che tecniche biofisiche che consentiranno di valutare la K_d dei composti in modo sperimentale e di elucidare le porzioni maggiormente coinvolte nell'interazione *host-guest*. Ciò permetterà inoltre l'ulteriore elucidazione del *binding mode* e la conseguente validazione dei modelli *in silico* utilizzati per la predizione del modo di *binding* delle molecole.



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

PUBBLICAZIONI

- Jose A Souto, Federica Sarno, Angela Nebbioso, Chiara Pappulino, Rosana Álvarez, Lucia Altucci, Jessica Lombino, Ugo Perricone, Alessandro Padova, Ángel R. De Lera, A new family of JmjC-containing domain KDM inhibitors inspired on natural product purpurogallin, 2020, Front Chem May 25;8:312. doi: 10.3389/fchem.2020.00312



MEDICINA RIGENERATIVA E IMMUNOTERAPIA

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

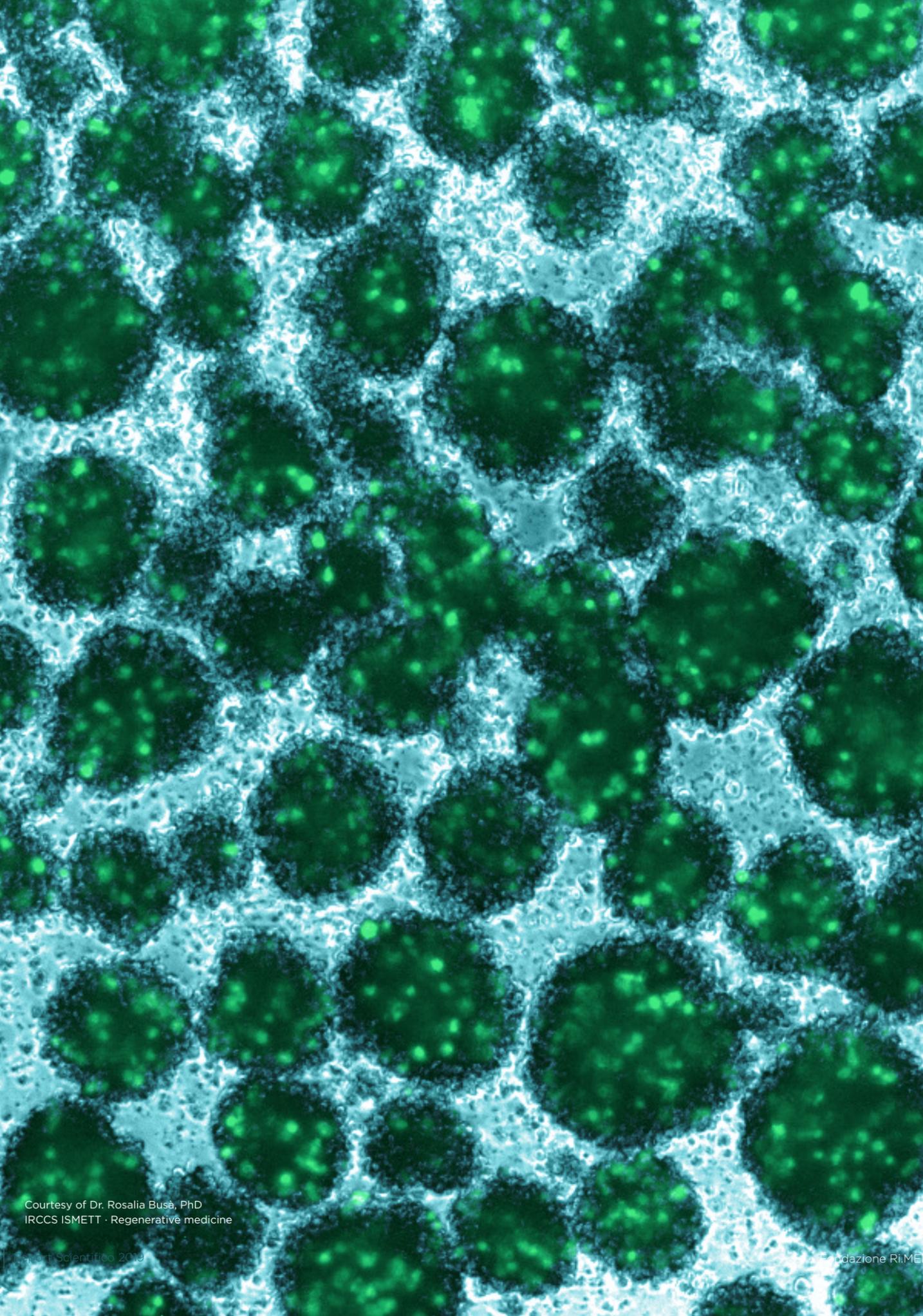
Le attività sono condivise con l'IRCCS ISMETT. Il team è costituito da personale tecnico e ricercatori esperti in attività di ricerca e sviluppo (studi *in vitro*, *in vivo* e *first-in-man*) e in manipolazione di campioni biologici di origine umana.

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

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

Altro importante *focus* di ricerca è rappresentato dallo sviluppo di terapie cellulari per la prevenzione di ricorrenze e il trattamento di infezioni post-trapianto. Alcuni progetti sono sviluppati in stretta collaborazione con i team di UP e UPMC di Pittsburgh. Questo permette di accelerare il processo di sviluppo preclinico verso il paziente grazie al trasferimento di protocolli e *know-how*.

La nuova generazione di vaccini, costituita da proteine ricombinanti, è diretta alla cura delle infezioni di maggiore interesse ospedaliero di diversa eziologia.



Courtesy of Dr. Rosalia Busà, PhD
IRCCS ISMETT · Regenerative medicine

Ingegnerizzazione delle cellule CAR-NK per il trattamento dell'epatocarcinoma cellulare

Ester Badami, PhD

Cellule Dendritiche regolatorie nella prevenzione del rigetto di organo

Ester Badami, PhD

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

Cinzia Chinnici, PhD

Creazione di cellule pluripotenti indotte umane (iPSCs) come modello *in vitro* per lo studio di malattie del fegato

Cinzia Chinnici, PhD

Sviluppo di un vaccino contro *Klebsiella pneumoniae*

Bruno Douradinha, PhD

Meccanismi di immunoevasione di *Klebsiella pneumoniae*

Bruno Douradinha, PhD

Sorveglianza e caratterizzazione di ceppi batterici multiresistenti di rilevanza clinica

Bruno Douradinha, PhD

Cluster linfoidi associati al grasso (FALC) come nicchie espandibili per lo sviluppo di un fegato ectopico

Maria Giovanna Francipane, PhD

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

Riccardo Gottardi, PhD

Sviluppo di un modello *ex vivo* di osteoartrite per il test di nuovi farmaci

Riccardo Gottardi, PhD

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

Monica Miele, PhD

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

Mariangela Pampalone

iRhom2: un nuovo target terapeutico in osteoartrosi?

Simone Dario Scilabra, PhD

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

Simone Dario Scilabra, PhD



I laboratori Ri.MED di Medicina Rigenerativa e Immunoterapia insieme ad IRCCS ISMETT



Fin dalla sua nascita la Fondazione Ri.MED ha collaborato con l'Istituto Mediterraneo per i Trapianti IRCCS ISMETT per l'utilizzo e la gestione dei laboratori di Medicina Rigenerativa.

Dal 2017 Ri.MED è entrata a far parte della compagine societaria dell'IRCCS ISMETT, gettando così le basi per la creazione di un centro integrato di ricerca e di cure di alta specializzazione a vantaggio dei pazienti, dello sviluppo economico del Sud d'Italia e dell'intero Paese.

Nei laboratori di Medicina Rigenerativa presso l'ISMETT vengono condotti programmi di ricerca preclinica, ricerca traslazionale e produzione di terapie cellulari (GMP Facility).

Accanto ad alcuni progetti fortemente orientati all'applicazione clinica, si procede con la traslazione di innovative terapie a base di prodotti cellulari, quali il trapianto di isole pancreatiche e l'immunoterapia adottiva. Realizzando la coesistenza di laboratori e di personale di ricerca all'interno dell'ospedale ad alta specializzazione, si intende facilitare gli scambi di conoscenze e di idee tra medici e ricercatori.

Il cluster Ri.MED/ISMETT culminerà nel progetto di realizzazione di un nuovo ospedale da 250 posti letto integrato al CBRB della Fondazione Ri.MED a Carini: un centro dove poter traslare velocemente i risultati della ricerca e garantire la completa interazione fra medici e ricercatori.

Ingegnerizzazione delle cellule CAR-NK per il trattamento dell'epatocarcinoma cellulare

Ester Badami, PhD
 ebadami@fondazionerimed.com



COLLABORAZIONI

- Istituto Zooprofilattico Sicilia IZS, Palermo, Italia
- Istituto Mediterraneo per i Trapianti e Terapie ad Alta Specializzazione (IRCCS ISMETT), Palermo, Italia



AREA TERAPEUTICA

Oncologia

PIPELINE



BREVE DESCRIZIONE

L'epatocarcinoma cellulare (HCC) è un tumore che origina dagli epatociti, cellule che costituiscono il fegato ed è spesso associato a epatiti croniche di origine virale e cirrosi. Il trattamento del tumore al fegato include epatectomia parziale, trapianto e chemio, ma il rischio di ricorrenza rimane alto soprattutto per le forme severe. Pertanto nuove strategie di trattamento sono necessarie per migliorare la prognosi dell'HCC. L'immunoterapia è un approccio alternativo ai trattamenti convenzionali. Le cellule *Natural killer* (NK) hanno un ruolo primario nella risposta immunitaria innata ai virus e tumori. La frequenza e la funzione delle NK residenti nel fegato sono strettamente correlate alla ricorrenza ed al

tasso di sopravvivenza in pazienti con HCC resecabile. Perciò si ritiene che le cellule NK epatiche svolgano un ruolo importante nella funzione del fegato e nei meccanismi di difesa immunologica contro l'HCC. Recentemente sono state sviluppate metodologie di modificazione genica per migliorare la specificità e l'efficacia citotossica delle NK contro cellule tumorali, come per esempio l'utilizzo delle molecole CAR (Chimeric Antigen Receptor). Questo studio prevede l'utilizzo di un costrutto innovativo per indurre nelle cellule NK citotossiche specificità verso un determinato antigene tumorale particolarmente rappresentato nell'HCC. Nostri dati preliminari (*paper submitted*) hanno dimostrato che la citochina

IMPATTO

L'ingegnerizzazione delle molecole CAR è stata maggiormente studiata nelle cellule T. Tuttavia, le CAR-NK presentano molteplici vantaggi rispetto alle CAR-T. Le CAR-NK comportano meno rischi di sviluppo di malattie autoimmuni e formazioni neoplastiche grazie alla loro vita più breve. Inoltre le citochine rilasciate dalle NK, come IFN- γ e *granulocyte-macrophage colony-stimulating factor* (GM-CSF), sono considerate clinicamente sicure rispetto alla tempeste citochiniche descritte tra gli effetti collaterali delle terapie CAR-T. A differenza delle CAR-T, le CAR-NK mantengono una capacità intrinseca di riconoscere ed uccidere una cellula tumorale attraverso i recettori che esprimono nativamente, e di conseguenza la possibilità che un tumore possa sfuggire ad una cellula NK è inferiore rispetto ad una cellula T. Infine, le cellule NK non necessitano di *matching molecule* del complesso di istocompatibilità HLA e non sono in grado di iniziare processi di *Graft-Vs-Host diseases*, rischi importanti associati alla immunoterapia CAR-T mediata. Tutto ciò porta alla consapevolezza che le cellule CAR-NK possono realmente rappresentare un prodotto "off-the-shelf" come opzione terapeutica. Lo scopo di questo studio è di ingegnerizzare cellule NK umane primarie con un CAR specifico per un antigene tumorale espresso nell'HCC. Il goal ultimo, è di ottenere un protocollo *virus-free* di produzione su larga scala di grado clonico.

RISULTATI RAGGIUNTI NEL 2020

Nel 2020, sono stati paragonati differenti approcci per ottenere le CR-NK desiderate: trasduzione lentivirale, retrovirale e nucleofezione *virus-free*. I supernatanti lentivirali e retrovirali sono stati prodotti tramite trasfezione di colture di cellule 293T o Phoenix, rispettivamente, insieme ai costrutti virali di packaging (LentiArtTM Virus Packaging Kit) ed il reagente di trasfezione

IFN significativamente aumenta l'attività anti-tumorale delle NK. Il vettore da noi disegnato è un costrutto di quarta generazione che a valle del CAR porta il segnale di attivazione transmembrana e le molecole di co-stimolazione citoplasmatica CD28 and 4-1BB. In aggiunta, il gene suicida Epidermal Growth Factor Receptor (EGFRt), che trasduce per una forma troncata ed inerte del recettore per il detto fattore di crescita. Il recettore lega l'anticorpo Cetuximab *in vivo* inducendo la morte delle cellule target per fissazione del complemento. Il gene suicida torna utile per prevenire inattesi effetti collaterali.

Lipofectamine3000. Per migliorare l'efficienza di trasduzione di cellule come le NK che sono normalmente resistenti al virus, abbiamo testato le seguenti condizioni di coltura: Polybrene, Retrofectin, Vectofusin and BX795.

Lentiviral transduction. Le cellule sono state trasfettate con due *pseudotyped lentiviral* costrutti: TAA-IL15-CAR and TAA-IFN α -IL15-CAR, paragonando Polybrene +/- Retrofectin e Vectofusin +/- Retrofectin. Una settimana dopo, tramite citofluorimetria abbiamo potuto osservare l'avvenuta trasfezione con una efficienza oscillante tra 12 e il 22% (Fig 1).

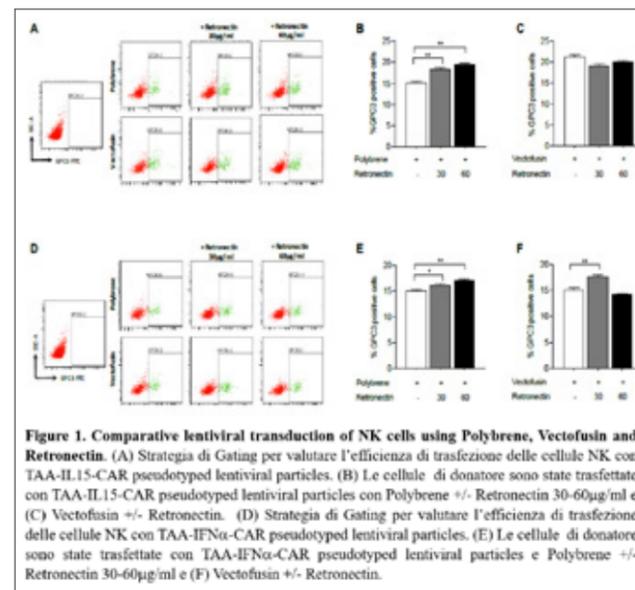


Figure 1. Comparative lentiviral transduction of NK cells using Polybrene, Vectofusin and Retrofectin. (A) Strategia di Gating per valutare l'efficienza di trasfezione delle cellule NK con TAA-IL15-CAR pseudotyped lentiviral particles. (B) Le cellule di donatore sono state trasfettate con TAA-IL15-CAR pseudotyped lentiviral particles con Polybrene +/- Retrofectin 30-60 μ g/ml e (C) Vectofusin +/- Retrofectin. (D) Strategia di Gating per valutare l'efficienza di trasfezione delle cellule NK con TAA-IFN α -CAR pseudotyped lentiviral particles. (E) Le cellule di donatore sono state trasfettate con TAA-IFN α -CAR pseudotyped lentiviral particles e Polybrene +/- Retrofectin 30-60 μ g/ml e (F) Vectofusin +/- Retrofectin.

Nucleofection. Le NK sono state nucleofettate con il kit della Lonza P3 Primary cell 4D-Nucleofector X Kit L e lo strumento 4D Nucleofector core X Unit. Per i dati preliminari di setting, abbiamo inizialmente testato il plasmide controllo pmaxGFP ed i seguenti programmi disponibili: EH100, EL100, FA100, EK100,

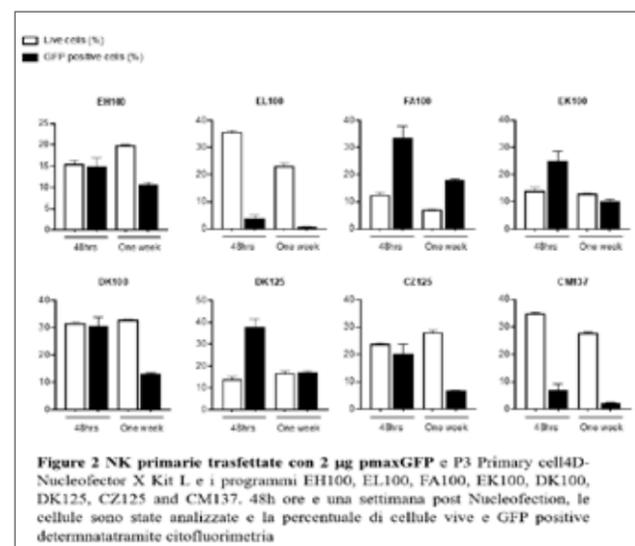


Figure 2 NK primarie trasfettate con 2 μ g pmaxGFP e P3 Primary cell4D-Nucleofector X Kit L e i programmi EH100, EL100, FA100, EK100, DK100, DK125, CZ125 and CM137. 48h ore e una settimana post Nucleofection, le cellule sono state analizzate e la percentuale di cellule vive e GFP positive determinate tramite citofluorimetria

DK100, DK125, CZ125 e CM137. La vitalità cellulare era sempre tra l'8% e il 36%, mentre l'espressione del *gene reporter* GFP tra l'1% e il 38% (Fig 2). Per concludere, il programma DK100 mostra la migliore efficienza di trasfezione e la più alta vitalità utilizzando il plasmide controllo (Fig. 2).

OBIETTIVI PER IL 2021

Testare l'efficienza in vivo delle cellule NK attivate con IFN α . Utilizzeremo un modello di topo immuno-compromesso NSG trapiantato ortotopicamente con una linea di tumore epatico che stabilmente esprime il *gene reporter* Luciferase, HepG2-Red-FLuc.

La crescita tumorale viene tracciata sull'animale vivo tramite Bioluminescenza *in vivo* (BLI) e lo strumento di acquisizione IVIS Spectrum Instrument (*In Vivo Imaging System*), che adotta una tecnologia di imaging *in vivo* ad alta intensità e basso rumore di fondo, che consente visualizzazione e tracciamento dell'attività cellulare all'interno di un organismo vivo in maniera non invasiva e *real-time* (Fig 3).

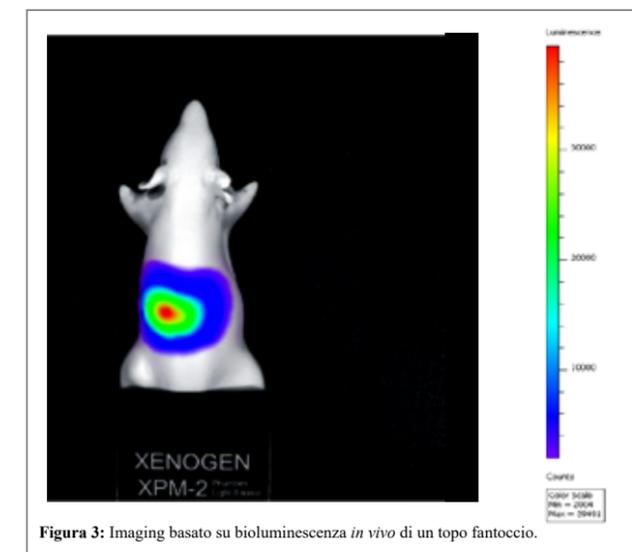


Figure 3: Imaging basato su bioluminescenza *in vivo* di un topo fantoccio.

Il protocollo è stato approvato dal Ministero della Salute per studiare l'efficacia delle cellule NK isolate da due pazienti ed attivate con IL2/IL15 o IFN α su un totale di 100 topi. Gli esperimenti verranno condotti in partnership con l'Istituto Zooprofilattico Sicilia (IZS).

Testare l'efficienza di trasfezione su fonti di cellule alternative come le NK da sangue cordonale.

Dal sangue cordonale è possibile isolare progenitori delle cellule NK grazie all'espressione esclusiva del marker di superficie CD34. I progenitori, essendo meno differenziati, proliferano a tassi superiori rispetto alle NK del periferico e

sono più permissive alla trasfezione genica, come riportato nella letteratura.

Quindi i progenitori cordonali CD34+ delle NK verranno isolati tramite microbiglie magnetiche e coltivati con specifici fattori di crescita e di differenziamento. Il transfer genico verrà eseguito confrontando i protocolli di trasfezione lentivirale, retrovirale e la nucleofezione *virus-free*.

CONFERENZE
Virtual ISCT2020 Meeting

PUBBLICAZIONI

- Human NK cells activated with IFN α fully eradicate HCV infection by releasing Galectin-9 and IFN γ , Ester Badami, Anna Paola Carreca, Massimiliano Gaetani, Rosalia Busà, Giovanna Russelli, Diego Pains, Claudia Carcione, Pier Giulio Conaldi - Submitted
- Donor Preconditioning with Inhaled Sevoflurane Mitigates the Effects of Ischemia-Reperfusion Injury in a Swine Model of Lung Transplantation, Alessandro Bertani, Vitale Miceli, Lavinia De Monte, Giovanna Occhipinti, Valeria Pagano, Rosa Liotta, Ester Badami, Fabio Tuzzolino, Antonio Arcadipane - *Biomed Res Int.* 2021 Jan 8; 2021

PROPRIETÀ INTELLETTUALE
Brevetto EPO n 178039749
A nome: Ri.MED, ISMETT
Titolo: NK-mediated immunotherapy and uses thereof

PRODOTTI: ATMP (ADVANCED THERAPY MEDICINAL PRODUCTS)

Cellule Dendritiche regolatorie nella prevenzione del rigetto di organo

Ester Badami, PhD
ebadami@fondazionerimed.com

COLLABORAZIONI
Thomas E. Starzl Transplantation Institute, University of Pittsburgh, USA

AREA TERAPEUTICA
Insufficienze d'organo

PIPELINE



BREVE DESCRIZIONE

Una delle problematiche più importanti nel trapianto è il rigetto di organo da parte del sistema immunitario. Infatti, la terapia immunosoppressiva (IST) viene somministrata a vita al ricevente, ma è associata a molti effetti collaterali. A tale riguardo si comprende l'importanza di esplorare risorse alternative, basate per esempio su terapie cellulari come l'uso delle Cellule Dendritiche Tollerogeniche (Tol-DCs) ideate per sospendere anticipatamente la IST.

Lo scopo di questo progetto è ottimizzare una terapia cellulare mediata da Tol-DCs per indurre tolleranza immunitaria operativa. Le Tol-DCs vengono ottenute a partire dal pro-

dotto cellulare di perfusione del fegato resecato dal donatore cadavere. Durante l'espanto di fegato dal donatore cadavere a cuore battente, la aorta viene chiusa ed il fegato perfuso attraverso la vena epatica. Il perfusato epatico così ottenuto è normalmente smaltito. Tuttavia, il perfusato rappresenta una risorsa cellulare importantissima, contenente un elevato numero di cellule circolanti nel sangue da/verso i tessuti, tra le quali i precursori delle DCs. Questi precursori, i monociti CD14+ messi in coltura per 7 giorni con fattori di crescita IL4/GM-CSF/IL-10 e Vitamin-D3 danno origine alle Tol-DCs, con elevato potenziale immuno-tollerogenico nei confronti di linfociti T eterologhi.

IMPATTO

I pazienti soggetti a trapianto di organo ricevono IST per il resto della loro vita. La IST è associata ad effetti collaterali debilitanti come tumori, infezioni, diabete, malattie cardiovascolari e insufficienza renale. Nel trapianto di organo, la forma ideale di immunosoppressione è quella specifica per il donatore, senza intaccare le difese immunitarie del ricevente né incrementare la suscettibilità ad infezioni di varia natura. Le Cellule Dendritiche, se opportunamente condizionate, possono esser utili allo scopo in quanto in grado di indurre tolleranza nelle cellule del ricevente verso gli antigeni dell'organo del donatore, le quali diventano *ipo-responsive* verso gli allo-antigeni sviluppando memoria immunitaria.

Le DCreg funzionalmente prevengono il rigetto di organo e permettono lo svezzamento anticipato del ricevente dalla IST.

Il trial in Fase I/II in atto a Pittsburgh presso il gruppo di Angus W. Thomsom consiste proprio nella somministrazione di DCreg in pazienti riceventi fegato da donatore vivente. Le DCreg sono ottenute dal prodotto di aferesi del donatore vivente. La frequenza di trapianti di fegato da donatore vivente è però piuttosto inferiore rispetto alla donazione da cadavere. La possibilità di applicare il protocollo delle Tol-DCs anche alla coorte di riceventi di organo da donatore cadavere aumenterebbe notevolmente la casistica, rendendo il trial a più ampio spettro.

La scelta del trapianto di fegato è promettente in quanto il fegato è un organo tollerogenico per definizione ma bene si adatta anche ad altri tipi di trapianto di organo soldo come il rene.

RISULTATI RAGGIUNTI NEL 2020

Nel 2020, sono stati processati n=37 campioni, di cui n=7 PBMC e n=30 perfusati epatici da donatore cadavere.

Su piccola scala, abbiamo dimostrato che le DCreg ottenute a partire dai monociti precursori CD14+ del perfusato in coltura per 7 giorni con IL4/GM-CSF/IL-10 e Vitamin-D3 sviluppano un funzione e fenotipo tollerogenico del tutto paragonabile a quello delle DCreg ottenute dai PBMC. Tramite citofluorimetria, abbiamo studiato l'espressione di marker di differenziamento cellulare come CD40, CD1c, CD80, HLA-DR, CD14, DC-SIGN, CD86 e PD-L1 (Fig 1A). CD40, CD1c, CD80 e HLA-DR vengono espresso in egual misura sia dalle DCreg che dalle DC mature (mDCs), mentre CD14 e DC-SIGN sono down-regolate dalle mDC ma non dalle DCreg, indicando la bontà del nostro setting sperimentale. Uno dei criteri di rilascio delle DCreg è il livello di espressione del ligando di co-inibizione PD-L1 frazionato al CD86, con un ratio minimo pari a 2. Le DCreg da noi generate rispettano sempre questo criterio (Fig 1B). Funzionalmente, abbiamo dimostrato che le DCreg da perfusato inducono solo una debole proliferazione in linfociti T CD4+ e CD8+ alloigenici (Figure 2A-B). Inoltre abbiamo mostrato che le DCreg sono resistenti alla maturazione indotta da un immunostimolante di origine batterica MPLA. Per concludere, possiamo generare DCreg a partire dai monociti CD14+ isolati dal perfusato epatico dei donatori cadavere.

OBIETTIVI PER IL 2021

Caratterizzazione della signature tollerogenica delle DCreg ottenute da perfusato epatico. DCreg e mDC generate dal perfusato verranno testate per la secrezione di citochine IL12, IL-6 e TNF α . Per caratterizzare l'induzione di tolleranza immunologica nelle cellule T, valuteremo le citochine IFN γ , IL-17A, IL-4, Perforin, Granzyme-B, IL-10, IL-6, IL-12p70, IL-1 β , IL-6 e TNF α secrete nel mezzo delle co-culture cellulari mDC/DCreg e linfociti alloigenici CD4+ e CD8+ T. L'espansione della popolazione di cellule regolatorie Treg verrà determinata tramite citofluorimetria con gli anticorpi CD4+CD25+CD127-Foxp3^{high}.

Produzione su larga scala di purezza clinica dei monociti derivati dal perfusato epatico. Nel 2021 faremo uno *scale-up* del protocollo di generazione delle DCreg GMP-compliant. Ottimizzeremo l'aferesi del perfusato epatico riducendo al massimo la frazione delle popolazioni contaminanti pre-elutrazione, come i granulociti.

Ottimizzazione del protocollo di isolamento dei precursori CD14+ tramite elutrazione. Il prodotto di aferesi del perfusato epatico da donatore cadavere verrà processato per elutrazione per ottenere una frazione pura di monociti. Personale qualificato del cluster ISMETT / Ri.MED verrà formato per l'utilizzo dello strumento di elutrazione ELUTRA (TERUMO-BCT). La frazione così ottenuta verrà messa in coltura con IL4/GM-CSF/Vit-D3/IL10 per generare DCreg. Queste cellule verranno testate per fenotipo e funzione per indurre memoria immunitaria in cellule T alloigeniche.

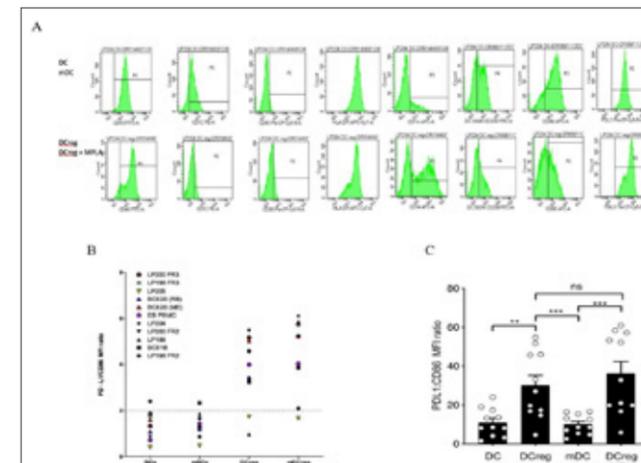


Figure 1. Analisi citofluorimetria delle DC/mDC (alto) versus DCreg/DCreg+MPLA (basso) (A). PD-L1:CD86 MFI ratio di DC ottenute da PMBC (n=4) e perfusato epatico (n=7). (B). PD-L1:CD86 MFI ratio di DC ottenute da perfusato epatico (n=11). Statistica eseguita con Wilcoxon t-test. ***p<0.05. Data sono espresso come mean \pm SEM. mDC, LPS-stimulated DC; DCreg+LPS, DCreg stimulated with LPS (C).

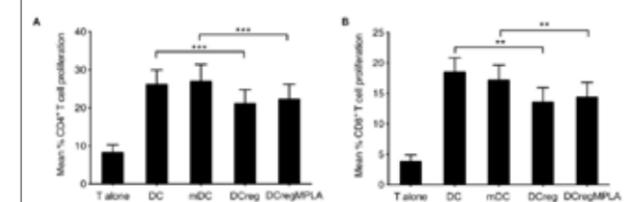


Figure 2. Proliferazione di cellule T alloigeniche stimulate con DCreg da monociti isolate da perfusato epatico (n=22). Cellule T alloigeniche marcate con CFSE vengono messe in coltura per 5 giorni con DC o DCreg (1DC:10T cells). DC o DCreg vengono stimulate con MPLA per 20 hr per ottenere mDC and Dcreg, respectively. La proliferazione delle T viene misurata con diluizione del CFSE e citofluorimetria. I dati sono rappresentati come mean \pm SEM. La significatività statistica è misurata con Wilcoxon t-test. *** p<0.05.

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

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

Cinzia Chinnici, PhD
cchinnici@fondazionerimed.com

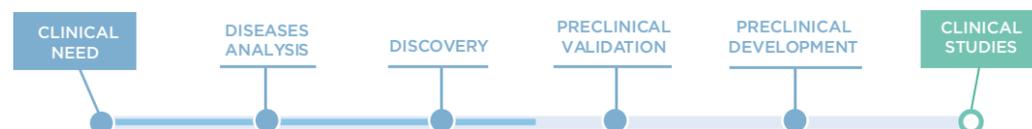
COLLABORAZIONI

- Istituto Mediterraneo per i Trapianti e Terapie ad Alta Specializzazione (IRCCS ISMETT), Palermo, Italia
- Laboratorio Polimeri Biocompatibili, STEBICEF - Università di Palermo, Palermo, Italia
- Dipartimento di Farmacia e Biotecnologie - Università di Bologna, Bologna, Italia

AREA TERAPEUTICA

Insufficienze d'organo

PIPELINE



BREVE DESCRIZIONE

L'efficacia terapeutica delle MSC, quando dimostrata, è da attribuire al secretoma, definito come l'insieme dei fattori bioattivi e immunomodulatori secreti dalle cellule (fattori di crescita, citochine, chemochine, vescicole extracellulari), capaci di stimolare i processi endogeni di riparo del tessuto.

Tuttavia, a differenza delle cellule, in grado di raggiungere il tessuto danneggiato una volta trapiantate, la somministrazione di secretoma necessita di biomateriali per un rilascio controllato. Il modo e la velocità con cui le cellule e i fattori solubili vengono rilasciati in corrispondenza del tessuto bersaglio ne influenza l'efficacia terapeutica e riveste, pertanto,

un'importanza fondamentale. L'obiettivo del progetto di ricerca è fornire delle soluzioni farmaceutiche che prolunghino la stabilità dei fattori solubili rilasciati dalle cellule. Al fine di soddisfare le esigenze cliniche specifiche, saranno testate diverse formulazioni di biomateriali.

Il progetto è stato organizzato in tre fasi nel seguente modo: **FASE 1:** caratterizzazione di fonte cellulare (ad esempio, derma fetale e cordone ombelicale) e prodotti cellulari. L'obiettivo della fase 1 è di stabilire il "miglior secretoma" per applicazioni di medicina rigenerativa quali riparo di ulcere in soggetti diabetici. I prodotti derivati dalla miglior fonte passano alla fase 2.

IMPATTO

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

RISULTATI RAGGIUNTI NEL 2020

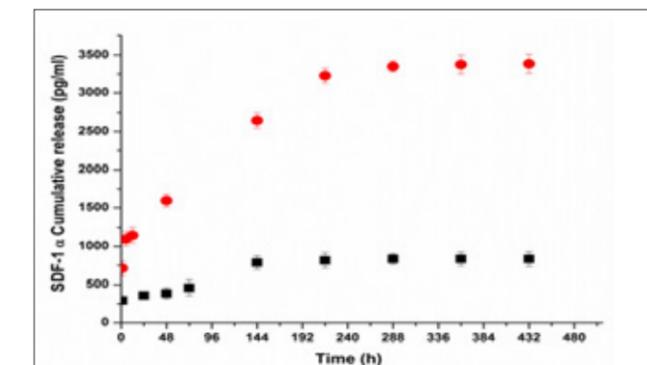
È stata prodotta una nuova formulazione del biomateriale a base di hydrogel da integrare col secretoma di MSCs per il rilascio prolungato. L'obiettivo è quello di ottenere un biomateriale completamente nuovo e che non fosse precedentemente brevettato. Tale biomateriale sarà validato *in vitro* (release kinetics studies) e poi adoperato nella *proof of concept in vivo* al fine di testarne l'efficacia sul modello murino di ulcera diabetica della Fondazione IRET (UNIBO).

Il manoscritto "Small extracellular vesicles from human fetal dermal cells and their microRNA cargo: KEGG signaling pathways associated with angiogenesis and wound healing" (Chinnici CM et al.) è stato pubblicato su Stem Cells Int. doi:10.1155/2020/8889379. Un secondo manoscritto è stato di recente sottomesso a Int J Mol Med ed è *under revision* ("Extracellular vesicle-derived microRNAs of human Wharton's jelly mesenchymal stromal cells may activate endogenous VEGF-A to promote angiogenesis", Chinnici CM et al.).

Un terzo manoscritto (Chinnici CM et al., "Hyaluronic acid/heparin-based hydrogels as delivery solutions for mesenchymal stromal cells and their secretome") è sempre in attesa di *submission* perché subordinato alla conduzione dello studio preclinico *in vivo*.

OBIETTIVI PER IL 2021

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



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

PUBBLICAZIONI

- Miceli V, Bertani A, Chinnici CM, et al. Conditioned Medium from Human Amnion-Derived Mesenchymal Stromal/Stem Cells Attenuating the Effects of Cold Ischemia-Reperfusion Injury in an In Vitro Model Using Human Alveolar Epithelial Cells. Accepted: Int. J. Mol. Med.
- Chinnici CM, Amico G, Gallo A et al. Small Extracellular Vesicles from Human Fetal Dermal Cells and Their MicroRNA Cargo: KEGG Signaling Pathways Associated with Angiogenesis and Wound Healing. Stem Cells Int. 2020 Aug 13;2020:8889379. doi: 10.1155/2020/8889379.
- Schmelzer E, Miceli V, Chinnici CM et al. Effects of Mesenchymal Stem Cell Coculture on Human Lung Small Airway Epithelial Cells. Biomed Res Int. 2020 Mar 27;2020:9847579. doi: 10.1155/2020/9847579.

FASE 2: sviluppo di prodotti biofunzionali pronti all'uso con composizione definita e meccanismo d'azione previsto, in grado di stabilizzare le proprietà del prodotto biologico e di fornire le dosi previste, adatte anche per la scalabilità di fabbricazione e la traslazione clinica. I prodotti con le proprietà biologiche più appropriate al trattamento di ferite cutanee passano alla fase 3. I biomateriali saranno costituiti da hydrogel di un derivato dell'acido ialuronico (HA-EDA). **FASE 3:** studi preclinici *in vivo* in modelli animali di wound healing. L'obiettivo della fase 3 è di testare e validare l'efficacia delle soluzioni terapeutiche proposte in modelli animali validati di patologie come le ulcere da pressione croniche in topi diabetici dbdb.



Spugna di HA-EDA hydrogel

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

Creazione di cellule staminali pluripotenti indotte umane (iPSCs) come modello in vitro per lo studio di malattie del fegato

Cinzia Chinnici, PhD
cchinnici@fondazionerimed.com

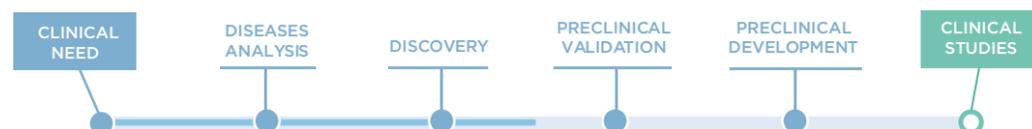
COLLABORAZIONI

Istituto Mediterraneo per i Trapianti e Terapie ad Alta Specializzazione (IRCCS ISMETT), Palermo, Italia

AREA TERAPEUTICA

Insufficienze d'organo

PIPELINE



BREVE DESCRIZIONE

Le cellule staminali pluripotenti indotte umane (iPSCs) nel "disease modeling" costituiscono un approccio versatile e promettente in molte aree biomediche.

Riprogrammando cellule somatiche "difettose" o "malate" (ad esempio, fibroblasti derivati da pazienti) si ottiene una fonte potenzialmente illimitata di iPSCs che porta con se il "difetto" e con la capacità di espandersi e differenziare in tipi cellulari differenti. In tal modo, lo studio di malattie di varia natura può essere condotto *in vitro* evitando di ricorrere, qualora sia possibile, ai modelli animali. *Disease modeling* basati su iPSCs possono essere adoperati per lo studio sia dei meccanismi patologici, che per lo screening di farmaci o ancora per studi di correzione del genoma umano.

In particolare, l'editing genomico per la correzione di malattie metaboliche epatiche mediante iPSCs si sta rivelando altamente promettente. Il "genome editing" funzionerebbe, però, nel caso di malattie monogeniche, cioè causate da un difetto in un singolo gene. L'obiettivo a grandi linee del progetto è quello di creare delle linee di iPSCs "patient-specific" (cioè che portano la mutazione genetica responsabile della malattia).

Le *patient-specific iPSCs* serviranno per testare l'efficienza dei vari gene editors *in vitro*. Ad esempio, epatociti ottenuti da *patient-specific iPSCs* verrebbero adoperati per testare l'efficienza di correzione dei vari "gene editors", intesa come capacità di correggere un gene/enzima difettoso essenziale per il metabolismo degli epatociti.

IMPATTO

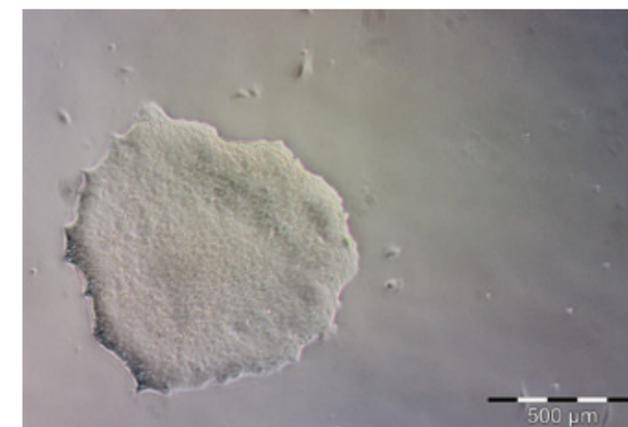
Il programma di trapianto di fegato presso IRCCS-ISMETT comprende pazienti pediatrici affetti da malattie metaboliche del fegato. Se si potesse usare il "genome editing" per il trattamento di tali malattie, basterebbe una singola somministrazione di "base/vector editors" per correggere in modo permanente il difetto genico e con implicazioni enormi in termini di miglioramento della qualità della vita dei pazienti.

RISULTATI RAGGIUNTI NEL 2020

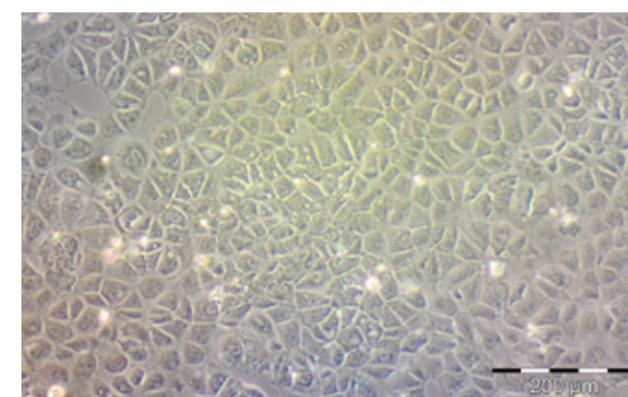
L'obiettivo del progetto (ancora in fase preliminare) è di acquisire una expertise nel campo delle iPSCs. Abbiamo ottenuto le prime iPSCs riprogrammando MSCs da derma fetale e da cordone ombelicale col metodo non-integrante del Sendai virus. Le iPSCs ottenute sono state espansive e criocongelate. Sono stati eseguiti i primi esperimenti di differenziamento verso il lineage epatocitico (ad esempio, a partire da iPSCs fino a endoderma definitivo ed epatoblasti).

OBIETTIVI PER IL 2021

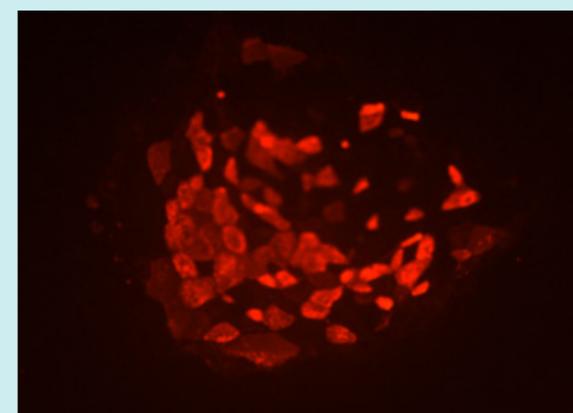
Ottimizzare i protocolli per generazione, espansione e *banking* di iPSCs umane. Saggi di differenziamento *in vitro* verso *lineages* epatici (es. epatociti o colangiociti, questi ultimi adoperati da Maria Giovanna Francipane per la conduzione del suo progetto). Messa a punto di saggi funzionali di cellule mature ottenute a partire da iPSCs. Caratterizzazione di iPSCs con approcci differenti (biologia molecolare e biochimica).



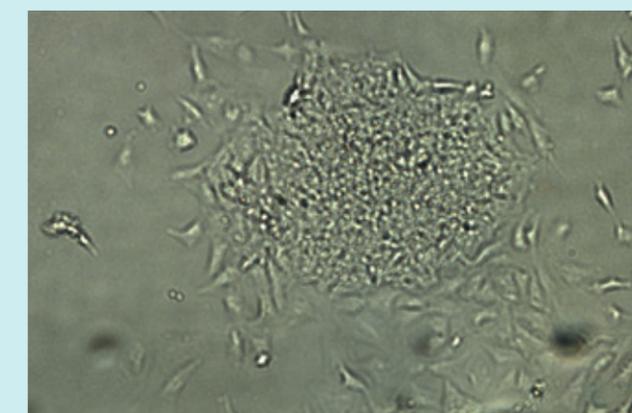
Colonia di iPSCs a passaggio 3



Endoderma definitivo ottenuto per differenziamento di iPSCs



A- Live stain con anticorpo anti-TRA-1-60 (rosso) specifico per iPSCs



B- Immagine precedente (A) vista in capo chiaro

PRODOTTI: FARMACI BIOLOGICI

Sviluppo di un vaccino contro *Klebsiella pneumoniae*

Bruno Douradina, PhD
bdouradina@fondazionerimed.com

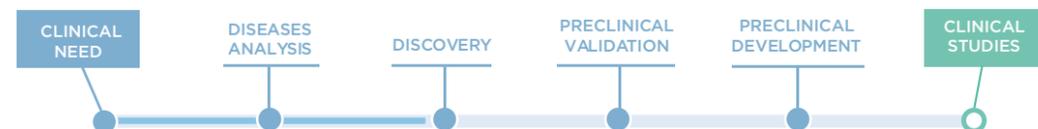
COLLABORAZIONI

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

AREA TERAPEUTICA

Malattie infettive

PIPELINE



IMPATTO

K. pneumoniae è un batterio Gram-negativo di importanza clinica, che colonizza prontamente le superfici della mucosa e, da lì, ha accesso ad altri tessuti e stabilisce infezioni gravi. È stata riportata resistenza a diversi antibiotici, riducendo il numero di trattamenti efficaci. *K. pneumoniae* sta diventando sempre più un problema di salute pubblica. In effetti, l'Organizzazione Mondiale della Sanità ha pubblicato una lista di batteri resistenti agli antibiotici in cui la necessità di nuovi interventi contro *K. pneumoniae* è considerata cruciale. Ad oggi, nessun vaccino è disponibile contro *K. pneumoniae*. Il nostro approccio di sviluppo di un vaccino contro questo patogeno multiresistente potrebbe diventare un'immunoterapia efficace contro *K. pneumoniae*, una volta che funzionerebbe anche per i ceppi multiresistenti responsabili per infezioni nosocomiali.

OBIETTIVI PER IL 2021

I nostri obiettivi per il 2021 sono di purificare i restanti potenziali antigeni individuati tramite vaccinologia inversa. Una volta ottenuti gli antigeni ricombinanti, faremo dei saggi ELISA usando i sieri di pazienti sopramenzionati e verificheremo la presenza di anticorpi sviluppati contro gli antigeni studiati. Questo ci dirà se gli antigeni scelti sono immunogenici per se, ossia, se durante il corso naturale di un'infezione con *K. pneumoniae* se si sviluppano anticorpi naturali contro questi antigeni. Abbiamo sottomesso la procedura per l'autorizzazione per fare gli studi sugli animali. Questo ci permetterà di ottenere sieri contenendo anticorpi contro gli antigeni scelti e studiare l'immunogenicità di questi antigeni, ad esempio, il loro potenziale di indurre una risposta immunitaria umorale. Gli anticorpi ottenuti saranno anche usati in altri saggi, ad esempio, in un approccio di immunizzazione passiva e opsonofagocitosi.

RISULTATI RAGGIUNTI NEL 2020

Nel corso di quest'anno, in collaborazione con l'IRCCS-ISMETT, abbiamo individuato sieri di pazienti di *K. pneumoniae*. Abbiamo selezionato circa di 100 campioni per ognuna delle condizioni: infettati (sangue, fluidi interni, infezioni urinarie con elevata carica batterica), colonizzazione (infezioni urinarie con bassa carica batterica, tamponi rettali) e negativi (senza presenza di *K. pneumoniae* registrata nei software di gestione ospedaliera di IRCCS-ISMETT). Tramite ELISA, e usando come coating estratti proteici totali di *K. pneumoniae*, abbiamo trovato dei sieri iperimmuni, ossia, con un alto titolo di anticorpi contro questo patogeno e sieri negativo, cioè, che non hanno avuto nessuna risposta contro *K. pneumoniae*. Con questi sieri, abbiamo verificato tramite ELISA che, per 3 degli antigeni che stiamo studiando, si sviluppano anticorpi contro durante l'infezione o la colonizzazione con *K. pneumoniae*. In particolare, uno degli antigeni induce *in vitro* una forte risposta di cellule T CD8+ produttrici di interferon-gamma mediante previa attivazione di cellule dendritiche, come comprovato per ELISpot.

BREVE DESCRIZIONE

In questo progetto, proponiamo lo sviluppo di un vaccino contro *K. pneumoniae* usando un approccio di vaccinologia inversa. Tramite *genome mining*, identificheremo antigeni conservati in ceppi di riferimento disponibili online e confermeremo la loro presenza nei genomi sequenziati di isolati clinici di *K. pneumoniae*. L'analisi informatica ci permetterà di individuare delle proteine di superficie presenti nella maggioranza degli isolati clinici di *K. pneumoniae*, che

saranno dei componenti di un potenziale vaccino. Così, questo vaccino funzionerà anche per i ceppi di *K. pneumoniae* multiresistenti ai farmaci, poiché i meccanismi che portano alla resistenza non possono evitare una risposta immunitaria diretta contro questi batteri. Siamo convinti che questo nuovo approccio sarà efficace contro *K. pneumoniae* e aiuterà a combattere questi agenti patogeni multiresistenti.



Isolato clinico di *K. pneumoniae*

Meccanismi di immunoevasione di *Klebsiella pneumoniae*

Bruno Douradina, PhD
bdouradina@fondazionerimed.com

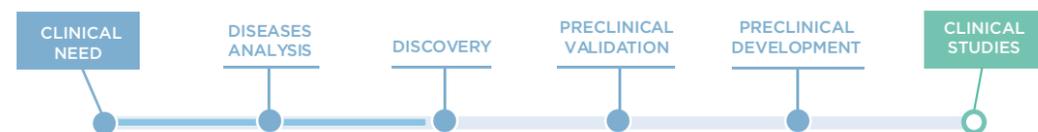
COLLABORAZIONI

- Istituto Mediterraneo per i Trapianti e Terapie ad Alta Specializzazione (IRCCS-ISMETT), Palermo, Italia
- Azienda Ospedaliera Universitaria Careggi, Firenze, Italia
- Vaxxilon gmbH, Berlino, Germania

AREA TERAPEUTICA

Malattie infettive

PIPELINE



BREVE DESCRIZIONE

Attualmente, diversi microrganismi patogeni possiedono una resistenza a più antibiotici che porta a un enorme aumento delle infezioni nosocomiali, alcune delle quali fatali. Tra queste, le infezioni da *Klebsiella pneumoniae* sono diffuse, soprattutto a causa della capacità plastica di questo batterio di acquisire geni di resistenza, compreso agli carbapenemi. Per stabilire infezioni efficienti, *K. pneumoniae* deve superare diverse difese immunitarie dell'ospite. I lipopolisaccaridi (LPS) svolgono un ruolo ambiguo, poiché entrambi attivano le ri-

sposte immunitarie ma possono anche svolgere un ruolo nell'evasione immunitaria. *K. pneumoniae* LPS può essere classificato in diversi sierotipi attraverso il loro antigene O. È interessante notare che i sierotipi O2a e O2afg sono prevalenti nella maggior parte dei ceppi di *K. pneumoniae* multiresistenti. In questo progetto, vorremo confermare se i LPS O2a e O2afg potrebbero fare parte di un meccanismo di immunoevasione tale che permetta ai ceppi multiresistenti di *K. pneumoniae* di evitare cellule dal sistema immunitario e propagarsi nell'organismo.

IMPATTO

Come detto precedentemente, *K. pneumoniae* è un patogeno di importanza clinica dovuto alla sua capacità di sviluppare resistenza a tutte le classi di antibiotici. Inoltre, *K. pneumoniae* ha dimostrato di essere in grado di evadere le risposte immunitarie tramite alcune proteine di superficie, come le fimbrie, e i suoi LPS. Comunque, questi meccanismi non sono ancora completamente conosciuti.

Una volta compreso come questo batterio riesca ad evadere il sistema immunitario, si potrebbero sviluppare nuove immunoterapie che preverrebbero la diffusione di *K. pneumoniae* nel corpo, impedendo così delle nuove infezioni. Queste terapie saranno molto adeguate ai pazienti di ospedali come l'IRCCS-ISMETT, che devono subire dei regimi di immunosoppressione, diventando così più suscettibili alle infezioni batteriche.

RISULTATI RAGGIUNTI NEL 2020

L'analisi genetica ha mostrato che la maggior parte degli isolati clinici di *K. pneumoniae* resistenti ai carbapenemi del nostro Istituto provengono dal sierotipo O2afg. Come dimostrato in precedenza, O2a e O2afg sono meno immunogenici, come confermato da ELISA utilizzando sieri di infezione da *K. pneumoniae* e colonizzazione di pazienti interni. Abbiamo osservato che, quando i monociti umani sono incubati con LPS estratto da ceppi O1, O2a o O2afg, sia O2a che O2afg, ma non O1, non sono riusciti a indurre la produzione di citochine infiammatorie, suggerendo un ruolo nell'evasione immunitaria. Tuttavia, i livelli di fagocitosi dei ceppi di *K. pneumoniae* che mostrano questi tre antigeni O da parte di monociti e granulociti umani sono simili. I nostri risultati indicano che i sierotipi LPS O2a e O2afg consentono agli isolati clinici multiresistenti di *K. pneumoniae* di evitare una risposta immunitaria infiammatoria iniziale e, di conseguenza, promuovere la loro diffusione sistemica, portando alle diverse patologie associate a questo batterio.

OBIETTIVI PER IL 2021

I nostri obiettivi per il 2021 sono di capire il ruolo della molecola NF-κB nel processo di infiammazione indotta dagli LPS studiato. È stato visto che questa molecola si trasloca per il nucleo cellulare dei monociti, inducendo così il processo infiammatorio. Vorremo controllare che i monociti, se incubati con LPS O2a e O2afg, non inducano una risposta infiammatoria e che il NF-κB rimanga nel citoplasma delle cellule. Vorremo anche studiare la fagocitosi da monociti e espressione di proteine batteriche che permettono di resistere alla fagocitosi tramite RT-PCR. Studieremo pure la espressione di small non-coding RNAs in ceppi di riferimento per i sierotipi di LPS O1, O2a e O2afg, per capire se ci sono delle differenze a livello di trascrizione.

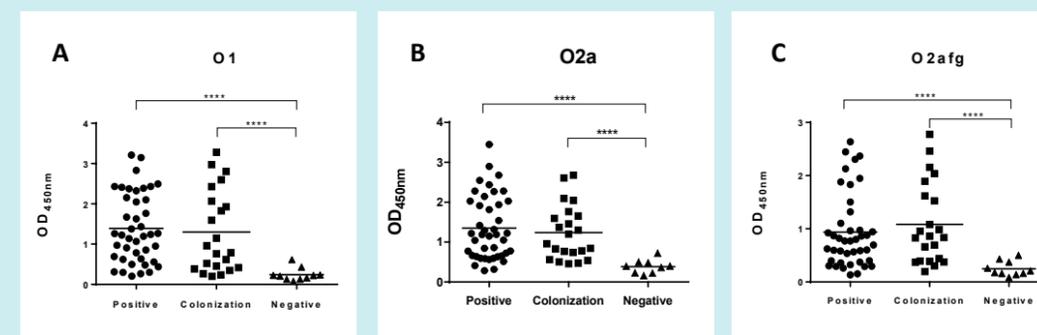


Fig. 1. Following *K. pneumoniae* infection or colonization, antibodies against LPS O1 (A), O2a (B) and O2afg (C) are present in human patients' sera. Sera samples were diluted 1:1000 (O1) or 1:100 (O2a and O2afg). Statistical analysis was done using the Mann-Whitney U test, **** p < 0,0001.

PRODOTTI: FARMACI BIOLOGICI

Sorveglianza e caratterizzazione di ceppi batterici multiresistenti di rilevanza clinica

Bruno Douradinha, PhD
bdouradinha@fondazionerimed.com

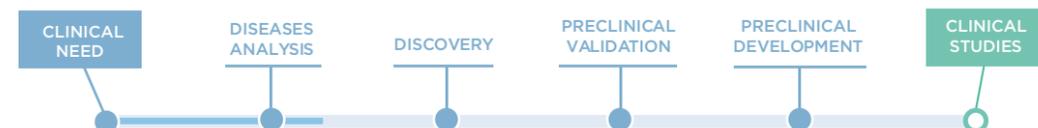
COLLABORAZIONI

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

AREA TERAPEUTICA

Malattie infettive

PIPELINE



BREVE DESCRIZIONE

Con questo progetto, vogliamo caratterizzare ceppi batterici particolari e/o multiresistenti che derivano dalla continua sorveglianza microbiologica presso il nostro partner clinico IRCCS-ISMETT. Il loro potenziale patogeno sarà valutato *in vitro*, per capire se questi isolati batterici possono diventare rilevanti al livello clinico. Gli isolati clinici batterici che dimostrano un particolare fenotipo, per esempio la resistenza a un particolare farmaco o una serie di farmaci, avranno il

loro materiale genomico sequenziato e confrontato con le informazioni attualmente disponibili nei database pubblici. Una volta identificati i modelli di resistenza ai farmaci, questi isolati clinici saranno classificati di conseguenza e, se si riscontra un particolare *sequence type* (ST) o nuove specie, sarà ulteriormente caratterizzato da saggi *in vitro*, ad esempio l'abilità di formazione di biofilm abiotico e cellulare e resistenza al siero umano.

IMPATTO

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

RISULTATI RAGGIUNTI NEL 2020

Stiamo analizzando in questo momento tutti i dati provenienti dai 208 genomi di ceppi di *K. pneumoniae* produttori dell'enzima KPC che è in grado di scindere i carbapenemi. Questi ceppi provengono dalla ceppoteca dell'IRCCS-ISMETT e sono stati raccolti dal 2008 al 2017, di vari episodi di infezione o colonizzazione di pazienti che sono stati ammessi all'ISMETT per trattamenti vari. Abbiamo confermato che, nei primi anni, i *sequence types* (ST) di questi isolati clinici erano, nella grande maggioranza ST258 o ST512, gli ST più predominanti in Italia. Negli anni successivi, abbiamo trovato un'enorme variazione degli ST, inclusi ST che non sono stati osservati prima in Italia, e pure isolati clinici nuovi ossia, senza ST ancora attribuiti. Stiamo raccogliendo i dati dei pazienti da cui sono stati isolati questi isolati clinici in rispetto al sesso, al tipo di trattamento che hanno avuto, se hanno subito un intervento di trapianto e altre informazioni che possono essere rilevanti.

OBIETTIVI PER IL 2021

I nostri obiettivi per il 2021 sono di definire e pubblicare i dati sopra descritti. Faremo un grafico del tipo *heat map* per capire l'evoluzione dei geni di resistenza, dei geni di virulenza e altri fat-

tori che troveremo rilevanti. Il lavoro sarà molto interessante perché comprenderà l'evoluzione epidemiologica dei diversi ceppi di *K. pneumoniae* durante gli ultimi anni all'IRCCS-ISMETT e sarà molto utile per i ricercatori che lavorano sull'epidemiologia di batteri antibiotico-resistenti.

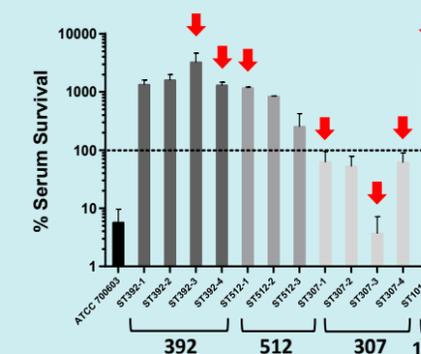
I nostri dati potranno indicare potenziali nuovi ST che potranno causare future epidemie in ospedali. Abbiamo già trovato e pubblicato in passato un ST che ha il potenziale di diventare un patogeno di rilevanza nosocomiale, lo ST392, che già si è propagato in Sicilia ed in Campania. Quindi, i nostri risultati potranno aiutare a prevedere come alcuni ST di *K. pneumoniae* si stanno difendendo e come combatterli.

CONFERENZE

- 14° Vaccine Elsevier Congress, Settembre 28-29° 2020 (online)
- New advances in basic and applied virology, Settembre 21° 2020 (online)
- Flanders Vaccine COVID-19 webinars, Giugno 18° e 25° 2020 (online)
- eSymposia Keystone Vaccinology in the Age of Pandemics: Strategies Against COVID-19 & Other Global Threats, Giugno 15-16° 2020 (online)

PUBBLICAZIONI

- D'Apolito D, Arena F, Conte V, De Angelis LH, Di Mento G, Carreca AP, Cuscino N, Russelli G, Iannolo G, Barbera F, Pasqua S, Monaco F, Cardinale F, Rossolini GM, Conaldi PG, **Douradinha B**. Phenotypical and molecular assessment of the virulence potential of KPC-3-producing *Klebsiella pneumoniae* ST392 clinical isolates. *Microbiol Res.* 2020 Nov;240:126551. doi: 10.1016/j.micres.2020.126551. Epub 2020 Jul 6.
- D'Apolito D, D'Aiello L, Pasqua S, Pecoraro L, Barbera F, **Douradinha B**, Di Martino G, Di Bartolo C, Conaldi PG. Strategy and validation of a consistent and reproducible nucleic acid technique for mycoplasma detection in advanced therapy medicinal products. *Biologicals.* 2020 Mar;64:49-57. doi: 10.1016/j.biologics.2020.01.001. Epub 2020 Jan 22.



K. pneumoniae ST392 che producono KPC-3 isolati clinici sono resistenti al siero umano

Cluster linfoidi associati al grasso (FALC) come nicchie espandibili per lo sviluppo di un fegato ectopico

Maria Giovanna Francipane, PhD
mgfrancipane@fondazionerimed.com

COLLABORAZIONI

- Lagasse Lab, McGowan Institute for Regenerative Medicine, Pittsburgh, USA
- Saint Barnabas Medical Center, Livingston, New Jersey, USA
- Mayo Clinic, Rochester, Minnesota, USA

AREA TERAPEUTICA

Insufficienze d'organo

IMPATTO

Il trapianto di fegato è attualmente l'unico trattamento efficace per i pazienti con grave insufficienza epatica. Sfortunatamente, vi è una crescente carenza di organi dovuta a molti fattori che vanno dal numero limitato di donatori, al numero crescente di pazienti in attesa di trapianto. Pertanto, è necessario sviluppare nuove terapie. Precedentemente, abbiamo identificato i linfonodi come un sito favorevole per l'attecchimento cellulare in modelli murini. Più di recente, abbiamo utilizzato il maiale affetto da tirosinemia ereditaria di tipo 1 (HT1, una malattia metabolica del fegato causata dalla carenza

dell'enzima FAH), per dimostrare che il trapianto di epatociti nei linfonodi è in grado di curare l'insufficienza epatica in modelli animali di grandi dimensioni. La nostra ulteriore scoperta che i FALC addominali possono anche supportare la sopravvivenza e la proliferazione degli epatociti trapiantati per via intraperitoneale fornisce un approccio aggiuntivo per lo sviluppo di fegati ectopici funzionali.

RISULTATI RAGGIUNTI NEL 2020

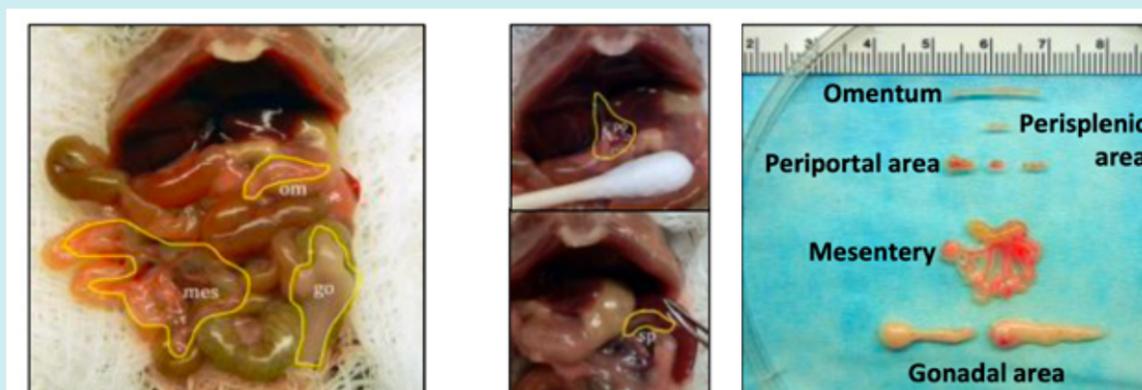
Abbiamo scoperto che i FALC sono loci ricettivi per gli epatociti trapiantati per via intraperitoneale. Sotto pressione selettiva nel topo tirosinemico FAH^{-/-}, gli epatociti *wild-type* attecchiti nei FALC hanno proliferato generando una massa con profilo trascrittomico simile a quello di un fegato sano, che ha curato i topi che altrimenti sarebbero morti per insufficienza epatica. Nei topi FRGN privi di FALC, il trapianto intraperitoneale di epatociti non è stato in grado di curare l'insufficienza epatica, ma in questi topi, i FALC potevano essere ripristinati dopo trapianto di cellule di midollo osseo prelevati da topi *wild-type*. Infine, l'induzione dell'infiammazione peritoneale tramite zymosan ha aumentato il numero di FALC, migliorando così l'attecchimento degli epatociti e accelerando il recupero dei topi tirosinemici dall'insufficienza epatica. In conclusione, i FALC addominali sono siti extraepatici essenziali per l'attecchimento degli epatociti dopo il trapianto intraperitoneale e, come tali, rappresentano una nicchia di facile accesso ed espandibile per la rigenerazione epatica ectopica quando è presente uno stimolo di crescita adeguato. A nostra conoscenza, questa è la prima evidenza riguardante il destino finale degli epatociti dopo iniezione nella cavità peritoneale.

PIPELINE



BREVE DESCRIZIONE

Il trapianto di epatociti rappresenta un approccio alternativo promettente al trapianto dell'intero fegato. Le principali vie di somministrazione di epatociti sono la via intraportale e la via intrasplenica. Sfortunatamente, l'alterata architettura del fegato e della milza, riscontrabile in molti pazienti con grave malattia epatica, è di ostacolo all'attecchimento cellulare. Il nostro gruppo ha dimostrato che i linfonodi sono siti eccellenti per lo sviluppo di tessuti ectopici. L'iniezione diretta di epatociti nei linfonodi ha generato un fegato ectopico funzionale in modelli animali preclinici di piccole e grandi dimensioni. Più recentemente, abbiamo testato se altre nicchie nella cavità addominale potessero supportare la sopravvivenza e la proliferazione degli epatociti trapiantati. Abbiamo scoperto che gli epatociti trapiantati mediante iniezione intraperitoneale attecchiscono e generano tessuti epatici funzionali all'interno dei cluster linfoidi associati al grasso (FALC), che sono strutture linfoidi terziarie integrate nel tessuto adiposo lungo tutta la cavità peritoneale.



Sinistra e centro: immagini grossolane che mostrano le 5 aree principali che contengono i FALC nella cavità addominale del topo (om: omento; mes: mesentere; go: area gonadica; po: area periportale; sp: area perisplenica). Destra: immagini che mostrano le 5 aree dissezionate. Il righello indica la dimensione dei tessuti (centimetri).

OBIETTIVI PER IL 2021

Studi futuri si concentreranno su metodi per indurre, in modo sicuro ed efficiente, un numero maggiore di FALC addominali, nonché sui meccanismi cellulari e molecolari che supportano l'attecchimento e la proliferazione degli epatociti in queste sedi.

PUBBLICAZIONI

- Nicolas CT, Kaiser RA, Hickey RD, Allen KL, Du Z, VanLith CJ, Guthman RM, Amiot B, Suksanpaisan L, Han B, Francipane MG, Cheikhi A, Jiang H, Bansal A, Pandey MK, Garg I, Lowe V, Bhagwate A, O'Brien D, Kocher JA, DeGrado TR, Nyberg SL, Lagasse E, Lillegard JB. (2020). Ex Vivo Cell Therapy by Ectopic Hepatocyte Transplantation Treats the Porcine Tyrosinemia Model of Acute Liver Failure. *Mol Ther Methods Clin Dev*, 18:738-750. doi: 10.1016/j.omtm.2020.07.009.-

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

Riccardo Gottardi, PhD
rgottardi@fondazionerimed.com

COLLABORAZIONI

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

AREA TERAPEUTICA

Patologie dell'invecchiamento

PIPELINE



BREVE DESCRIZIONE

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

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

IMPATTO

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

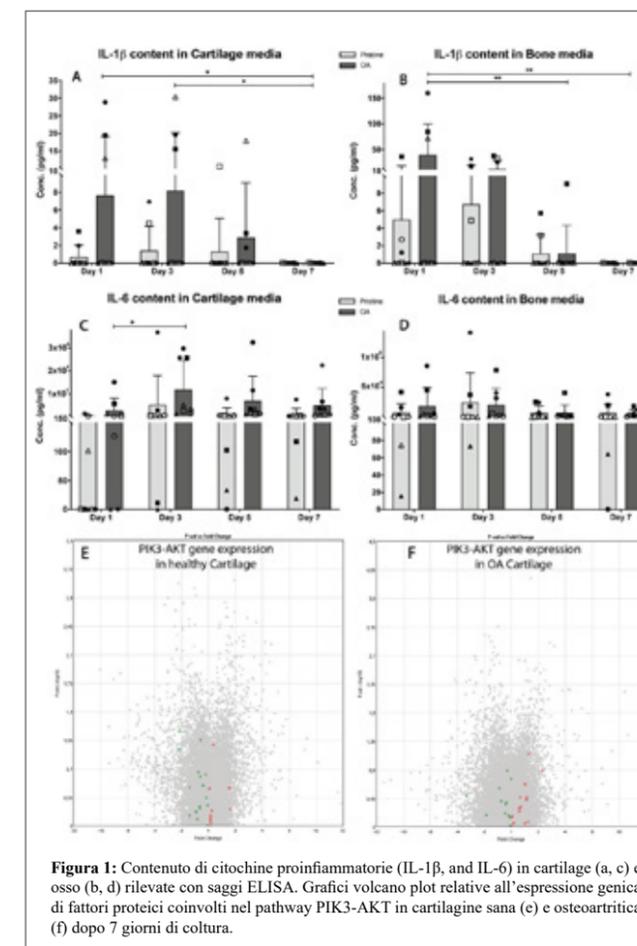


Figura 1: Contenuto di citochine proinfiammatorie (IL-1 β , and IL-6) in cartilagine (a, c) e osso (b, d) rilevate con saggi ELISA. Grafici volcano plot relative all'espressione genica di fattori proteici coinvolti nel pathway PIK3-AKT in cartilagine sana (e) e osteoartrosica (f) dopo 7 giorni di coltura.

RISULTATI RAGGIUNTI NEL 2020

Il nostro approccio sperimentale ci ha consentito di determinare e quantificare i mediatori dei processi infiammatori coinvolti nello sviluppo della patologia osteoartrite, sia nel tessuto cartilagineo che in quello osseo. Inoltre, grazie all'uso di *plugs* osteocondrali, siamo stati in grado di mettere in risalto i meccanismi di *Crosstalk* tra la superficie articolare ed il sottostante strato di tessuto osseo subcondrale. Questo ci ha consentito di delineare un ruolo attivo del tessuto osseo nella produzione di citochine proinfiammatorie quali IL-1 β e IL-6. Inoltre, siamo stati in grado di valutare l'espressione genica che promuove la sintesi di fattori proteici inseriti nel *pathway* di PIK3-AKT, coinvolto nella regolazione dell'omeostasi cartilaginea ed ossea nell'osteoartrite. Tali risultati sono stati possibili grazie all'impiego di tessuti umani osteoartrosici derivanti da scarti chirurgici da artroplastica al ginocchio. Abbiamo messo a punto e standardizzato protocolli sperimentali finalizzati all'estrazione dai tessuti di unità morfo-funzionali osteocondrali (*plugs*) ed al loro mantenimento in cultura dinamica *ex vivo* tramite l'uso di bioreattori bifasici.

OBIETTIVI PER IL 2021

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

CONFERENZE

- I. Chiesa, C. De Maria, A. Lapomarda, G.M. Fortunato, R. Di Gesù, F. Montemurro, G. Vozzi, **R. Gottardi**. Endothelial cells promote osteogenesis in an *in vitro* vascularized bone model developed by 3D bioprinting. Summer Biomechanics, Bioengineering, and Biotransport Conference - SB3C, virtual conference, June 2020
- I. Chiesa, C. De Maria, A. Lapomarda, G.M. Fortunato, R. Di Gesù, S. Aliakbarighavimi, F. Montemurro, R.S. Tuan, G. Vozzi, **R. Gottardi**. Endothelial cells support osteogenesis in a vascularized 3D bioprinted *in vitro* bone model. Orthopaedic Research Society Annual Meeting, Houston, TX, February, 2020

PUBBLICAZIONI

- I. Chiesa, C. De Maria, A. Lapomarda, G.M. Fortunato, F. Montemurro, R. Di Gesù, R.S. Tuan, G. Vozzi, **R. Gottardi**. Endothelial cells support osteogenesis in an *in vitro* vascularized bone model developed by 3D bioprinting. *Biofabrication*. 2020, 12(2):025013. DOI: 10.1088/1758-5090/ab6a1d.

PRODOTTI: FARMACI - BIOMARCATORI - DISPOSITIVI BIOMEDICALI E ORGANI ARTIFICIALI

Sviluppo di un modello *ex vivo* di osteoartrite per il test di nuovi farmaci

Riccardo Gottardi, PhD
rgottardi@fondazionerimed.com

COLLABORAZIONI

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

AREA TERAPEUTICA

Patologie dell'invecchiamento

PIPELINE



BREVE DESCRIZIONE

L'osteoartrite (OA) è una malattia multifattoriale che coinvolge tutti i tessuti delle articolazioni, provocando la degenerazione della cartilagine articolare, la sclerosi ossea subcondrale e l'infiammazione sinoviale. I danni ai tessuti compromettono gravemente la funzionalità complessiva dell'articolazione, culminando in dolori articolari e disabilità.

L'osteoartrite è caratterizzata da un'etiologia complessa in cui sembrano essere coinvolti fattori sia genetici che acquisiti.

In particolare, è bene notare che l'insorgenza dell'OA è caratterizzata da stimoli pro-infiammatori responsabili delle modificazioni che portano al danno cartilagineo e osseo. Recenti scoperte hanno evidenziato la rilevante influenza del microbioma intestinale nella regolazione del processo infiammatorio nell'organismo.

Nel caso particolare dell'OA, la comunità scientifica ha dato importanza all'asse diretto che collega intestino e articolazioni.

IMPATTO

Finora sono stati condotti diversi studi *in vitro* su colture di condrociti per chiarire la correlazione tra LPS e osteoartrite. Tuttavia, questo approccio non ha fornito informazioni rilevanti riguardo l'effetto dell'LPS su scala macroscopica.

Con questo lavoro ci proponiamo di sviluppare un modello di osteoartrite incentrato sull'induzione di processi infiammatori su espianti osteocondrali nativi sani al fine di osservare l'effetto di uno stimolo pro-infiammatorio a livello cellulare e tissutale. Sorprendentemente, il nostro modello riproduce realisticamente in scala microscopica l'ambiente fisiologico delle articolazioni, configurandosi come una piattaforma avanzata di screening dei farmaci. Tale tecnologia apre la strada al miglioramento del processo di screening dei farmaci, promuovendo, inoltre, la scoperta di nuove potenziali terapie farmacologiche per il trattamento dell'OA.

RISULTATI RAGGIUNTI NEL 2020

Con questo progetto siamo riusciti a sviluppare con successo un modello *ex vivo* responsivo di osteoartrite basato su plugs osteocondrali (OC) ottenute da suini sani.

I tessuti sono stati prelevati da aree della troclea femorale selezionando accuratamente zone macroscopicamente intatte. Poiché il nostro scopo è studiare l'influenza del microbioma intestinale sull'insorgenza dell'osteoartrite, abbiamo utilizzato LPS per indurre una risposta infiammatoria simile all'OA nei tessuti osteocondrali.

Dopo 3 giorni di esposizione a LPS, la cartilagine di tali tessuti ha mostrato le caratteristiche modificazioni dell'osteoartrite che si notano comunemente nei tessuti nativi affetti da OA.

Tra le modificazioni più evidenti, abbiamo riscontrato una perdita di contenuto in proteoglicani e una massiccia fibrillazione cartilaginea. Il trattamento dei tessuti con un farmaco antinfiammatorio ha portato ad una completa regressione della patologia indotta, ricostituendo una struttura molto simile a quella nativa.

Diversi studi hanno trovato una correlazione tra metaboliti pro-infiammatori derivati dal microbioma intestinale e osteoartrite negli esseri umani ed è interessante notare che il lipopolisaccaride (LPS) è tra i metaboliti batterici più attivi nell'evocare una risposta infiammatoria immuno-mediata nelle articolazioni. In questo contesto, il nostro lavoro ha lo scopo di esplorare in profondità il danno indotto da LPS a livello tissutale e cellulare e il suo ruolo nell'osteoartrite.

Questi risultati suggeriscono che il nostro modello di OA *ex vivo* imita fedelmente le dinamiche che si verificano nelle articolazioni durante un'infiammazione innescata da LPS, e può essere impiegata per il test di nuove molecole per lo sviluppo di un trattamento farmacologico dell'osteoartrite.

OBIETTIVI PER IL 2021

Il nostro modello responsivo di OA *ex vivo* è un sistema promettente che può dare un contributo rilevante nello sviluppo di una terapia contro l'osteoartrite.

Nei nostri studi futuri, prevediamo di sviluppare un modello ancora più realistico che utilizzi tessuti umani per lo screening di nuovi farmaci anti-OA. Inoltre, ci proponiamo di utilizzare il nostro modello come piattaforma preclinica per testare un approccio avanzato cell-free che sfrutti le spiccate proprietà immunomodulatorie delle cellule staminali.

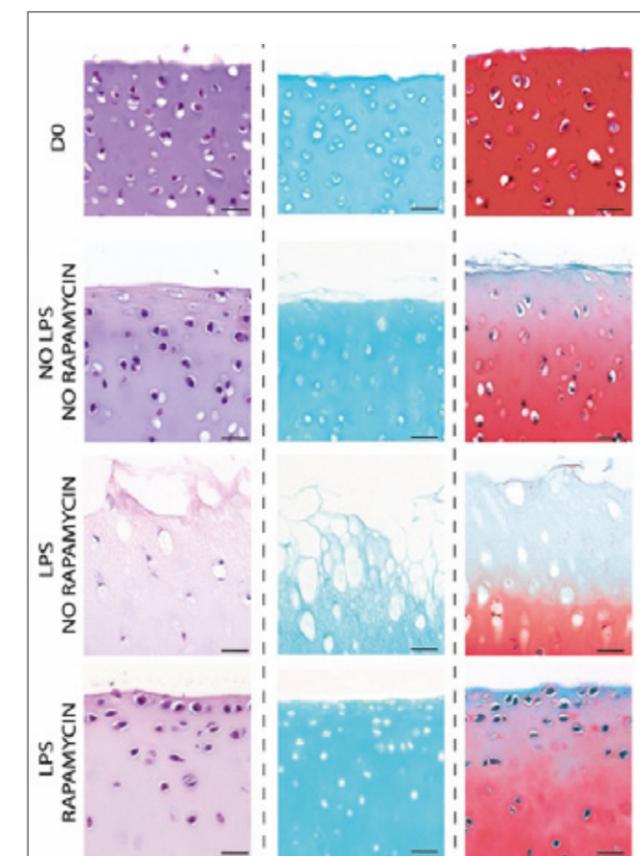


Figura 1: Sezioni istologiche di cartilagine trattate utilizzando il nostro modello *ex vivo* di osteoartrite. I tessuti soggetti a un danno indotto da LPS mostrano una perdita di proteoglicani e una fibrillazione superficiale (LPS / NO RAPAMYCIN). Il trattamento con un farmaco antinfiammatorio ha riparato il danno tissutale e ha ristabilito una morfologia nativa (LPS / RAPAMYCIN). I tessuti non trattati (NO LPS / NO RAPAMYCIN) non sono stati influenzati dalla nostra piattaforma di coltura ed erano simili ai tessuti nativi (D0)

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

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

Monica Miele, PhD
mmiele@fondazionerimed.com

COLLABORAZIONI

Istituto Mediterraneo per i Trapianti e Terapie ad Alta Specializzazione (IRCCS ISMETT), Palermo, Italia

AREA TERAPEUTICA

Insufficienze d'organo

PIPELINE



IMPATTO

I processi infettivi, in particolare causati da agenti virali, costituiscono la causa principale di morbilità e mortalità post-trapianto. Fino al 75% dei pazienti trapiantati sviluppa infezioni nel corso del primo anno post-trapianto. La causa primaria del fenomeno è riconducibile all'inibizione della risposta immune cellulo-mediata virus-specifica indotta dai farmaci immunosoppressori utilizzati per la prevenzione del rigetto. Poiché le cellule T giocano un ruolo chiave nel controllo e nella clearance delle infezioni virali, lo stato di immunodepressione facilita casi di infezione primaria, reinfezione o riattivazione di agenti virali ad elevata prevalenza, quali ad esempio i virus erpetici (es. EBV, CMV e HHV-8), con possibile sviluppo di patologie sistemiche o di organo. Il trattamento di queste infezioni presenta problematiche rilevanti sia per la scarsità dei farmaci antivirali utilizzabili sia per la loro tossicità. Una possibilità alternativa, ormai validata clinicamente, è rappresentata dai linfociti

T virus-specifici, un prodotto Medicinale di Terapia Avanzata (ATMP). L'infusione di tali cellule del sistema immunitario consente al paziente di sviluppare *in vivo* una risposta citotossica nei confronti delle cellule infettate, che potrebbe risultare efficace sia nella profilassi sia come terapia per trattare manifestazioni patologiche virus-indotte potenzialmente letali per il paziente.

RISULTATI RAGGIUNTI NEL 2020

Dopo avere ottimizzato il protocollo di produzione (2019), durante il 2020 ci siamo concentrati maggiormente sull'utilizzo di nuovi sistemi di coltura "in larga scala".

La richiesta di un'espansione *ex vivo* delle cellule, necessaria per ottenere un numero sufficiente di linfociti T per trattare i pazienti, comporta l'utilizzo di device per uso clinico per la coltura delle cellule che permetta di ottenere una resa maggiore del prodotto finale con pochi passaggi in laboratorio. In particolare, le cellule sono state coltivate parallelamente al sistema tradizionale (piastre multipozzetto) in sistemi innovativi quali G-Rex®6M Well Plate e G-Rex®10. Sono stati studiati ed analizzati, ad intervalli temporali regolari la concentrazione di glucosio e di lattato deidrogenasi nel mezzo di coltura, quali indicatori di crescita in alternativa alla classica conta cellulare.

Tale approccio consentirebbe l'ottimizzazione sia dei tempi di sostituzione del mezzo di coltura che d'integrazione dei fattori di crescita/citochine. I risultati dei suddetti parametri sono stati correlati alla crescita cellulare in ogni sistema di coltura testato. Nell'ambito della produzione dei linfociti contro HHV-8, abbiamo analizzato la risposta T specifica dei pazienti con viremia/manifestazione clinica da infezioni da HHV-8 come la KICS (KSHV inflammatory cytokine syndrome), a diversi intervalli di tempo, in seguito a stimolazione con miscele di peptidi virali.

OBIETTIVI PER IL 2021

Con la consegna dei nuovi laboratori di produzione, al termine delle convalide della struttura, l'obiettivo principale della produzione per il 2021 sarà l'inizio delle convalide legate al processo di produzione di linfociti T multivirus specifici necessarie per richiedere l'autorizzazione all'uso clinico.

BREVE DESCRIZIONE

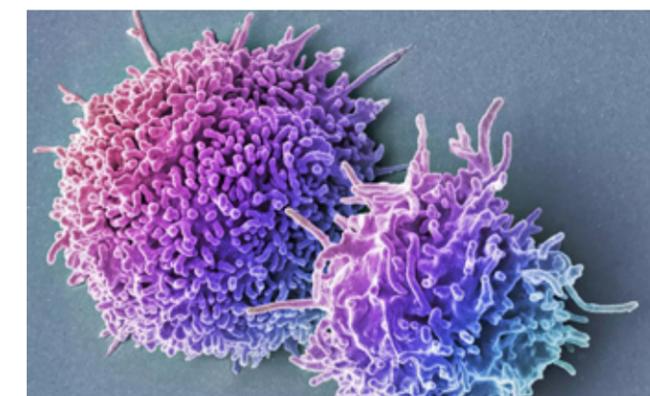
L'infusione di linfociti T virus specifici rappresenta una valida e alternativa strategia terapeutica ai farmaci antivirali convenzionali per il trattamento delle complicanze *virus-relate* nei pazienti trapiantati d'organo.

Al fine di aumentare le potenzialità cliniche di questa immunoterapia cellulare stiamo sviluppando nei nostri laboratori di ricerca approcci innovativi per generare e selezionare dei cloni T *multi-virus* specifici.

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

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

Inoltre, la futura creazione di una banca di linfociti T multi-virus specifici eterologhi garantisce la disponibilità di un prodotto "pronto all'uso", nello specifico cellule derivanti da un donatore compatibile, da somministrare al paziente al momento della diagnosi di una complicanza post-trapianto *virus-relata*.



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

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

Mariangela Pampalone
mpampalone@fondazionerimed.com

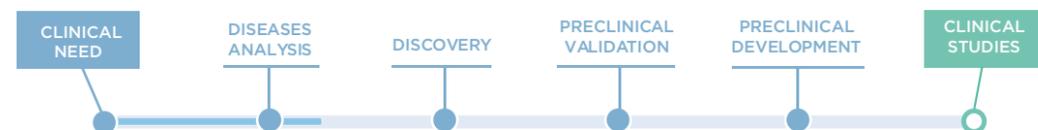
COLLABORAZIONI

Istituto Mediterraneo per i Trapianti e Terapie ad Alta Specializzazione (IRCCS ISMETT), Palermo, Italia

AREA TERAPEUTICA

Insufficienze d'organo

PIPELINE



BREVE DESCRIZIONE

I pazienti con cirrosi epatica presentano un aumentato rischio di sviluppare insufficienza multiorgano a causa di infezioni causate da traslocazione batterica causata dal passaggio di batteri e dei loro prodotti, come le endotossine, dal lume alla parete intestinale e dai linfonodi mesenterici al torrente circolatorio.

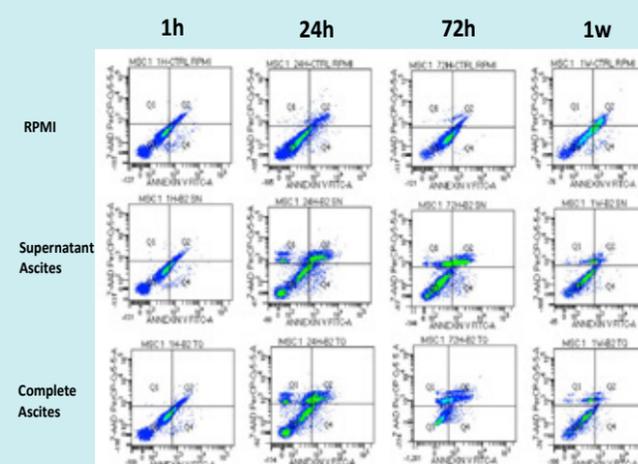
I batteri e i loro prodotti sono in grado di attivare il sistema immunitario con aumento del rilascio di mediatori in grado di indurre la sindrome da risposta infiammatoria sistemica (SIRS) la cui progressione culmina nell'insufficienza multiorgano (MOF).

Le alterazioni funzionali delle difese batteriche dell'immunità umorale aspecifica e cellulo-mediata, facilitano l'attecchimento di infezioni nelle varie sedi, incluso il liquido ascitico, con il rischio di sviluppare PBS (Peritonite Batterica Spontanea). In questo studio *in vitro* è stato valutato l'effetto delle cellule mesenchimali amniotiche umane, hA-MSCs, sulle componenti del fluido ascitico ottenuto da pazienti cirrotici con ascite refrattaria.

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

IMPATTO

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



RISULTATI RAGGIUNTI NEL 2020

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

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

I risultati ottenuti mostrano una diminuzione della produzione di citochine pro-infiammatorie associata ad una maggiore polarizzazione antinfiammatoria della componente macrofagica M2-like in presenza delle hA-MSCs. Non vi è tuttavia un decremento significativo della componente macrofagica M1-like che potrebbe determinare una continua attività fagocitica per il ripristino delle condizioni fisiologiche.

I risultati ottenuti potrebbero essere la base per investigare ulteriormente il ruolo terapeutico delle hA-MSC nella clearance batterica e nella fagocitosi dei macrofagi nella PBS.

OBIETTIVI PER IL 2021

Valutazione della componente macrofagica M1/M2-like e della carica batterica di liquido ascitico con diversi gradi di infezione batterica in seguito a co-coltura con cellule stromali mesenchimali placentari.

PUBBLICAZIONI

- *Human Amnion-derived Mesenchymal Stromal Cells in Cirrhotic Patients with Refractory Ascites: A Possible Anti-Inflammatory Therapy for Preventing Spontaneous Bacterial Peritonitis*
Mariangela Pampalone, Simona Corrao, Giandomenico Amico, Giampiero Vitale, Rossella Alduino, Pier Giulio Conaldi, Giada Pietrosi. *Stem Cell Rev and Rep.* <https://doi.org/10.1007/s12015-020-10104-8>
- *Human amniotic stem cells improve hepatic microvascular dysfunction and portal hypertension in cirrhotic rats*
Giada Pietrosi, Anabel Fernández-Iglesias, Mariangela Pampalone, Martí Ortega-Ribera Juan J. Lozano Héctor García-Caldaró Laia Abad-ordà Pier G. Conaldi Ornella Parolini Giovanni Vizzini Angelo Luca Jaime Bosch Jordi Gracia-Sancho. *Liver International* <https://doi.org/10.1111/liv.14610>
- *The Immunomodulatory Properties of the Human Amnion-Derived Mesenchymal Stromal/Stem Cells Are Induced by INF- γ Produced by Activated Lymphomonocytes and Are Mediated by Cell-To-Cell Contact and Soluble Factors*
Matteo Bulati, Vitale Miceli, Alessia Gallo, Giandomenico Amico, Claudia Carcione, Mariangela Pampalone and Pier Giulio Conaldi. *Front Immunol.* 11: 54 doi: 10.3389/fimmu.2020.00054

iRhom2: un nuovo target terapeutico in osteoartrosi?

Simone Dario Scilabra, PhD
sdscilabra@fondazionerimed.com

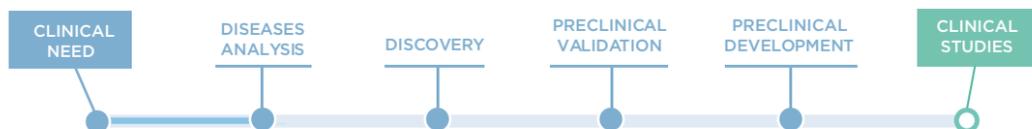
COLLABORAZIONI

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

AREA TERAPEUTICA

Patologie dell'invecchiamento

PIPELINE



BREVE DESCRIZIONE

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

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

IMPATTO

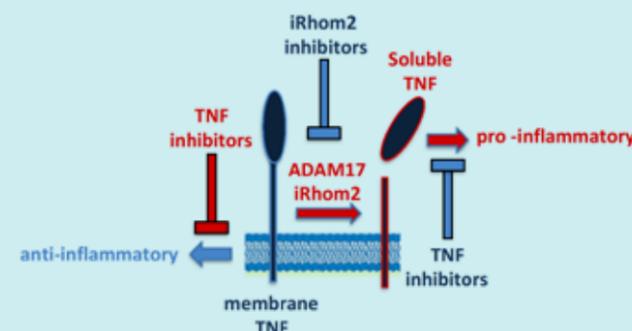
Il progetto proposto si prefigge di esaminare il ruolo di iRhom2 nel contesto dell'OA. iRhom2 guida il traffico molecolare e la maturazione di ADAM17, una proteasi con un ruolo cruciale nello sviluppo e nell'infiammazione. Sebbene basato su solidi dati proteomici, il progetto è altamente innovativo.

Innanzitutto, il progetto mira allo sviluppo di una nuova terapia per l'OA. Infatti, questo studio prevede di generare una molecola che sia in grado di bloccare la funzione di iRhom2 e quindi il rilascio di TNF e l'inattivazione di LRP-1.

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

RISULTATI RAGGIUNTI NEL 2020

Dopo aver finalizzato l'MTA con la University Health Network (UHN, Toronto, Canada) per l'uso del topo transgenico *knockout* per iRhom2, abbiamo iniziato gli esperimenti di osteoartrosi su questi topi, in collaborazione con George Bou-Gharios presso l'Università di Liverpool. I primi risultati saranno disponibili prima dell'estate 2021. Oltre agli esperimenti *in vivo*, il team di proteomica ha condotto una serie di esperimenti volti a caratterizzare il *turnover* di specifiche proteasi coinvolte nella



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

OBIETTIVI PER IL 2021

Il 2021 sarà un anno cruciale per questo progetto. Prima di tutto, porteremo a completamento lo studio *in vivo* sul ruolo di iRhom2 nello sviluppo dell'osteoartrosi. Dai nostri risultati preliminari ci aspettiamo che la delezione di iRhom2 migliorerà la progressione della malattia riducendo lo spegnimento di LRP-1 e i livelli extracellulari di MMP-13, ADAMTS-4 e ADAMTS-5. Inoltre, useremo la proteomica per analizzare la cartilagine dei topi con OA. Questo studio fornirà informazioni interessanti sulle alterazioni nel bilancio dei fattori catabolici/anabolici della matrice extracellulare, e quindi sui potenziali *pathway* molecolari regolati da iRhom2 che inducono l'OA. Potenzialmente, questo studio potrebbe identificare nuovi meccanismi, oltre al *turnover* della metalloproteasi, che possono essere coinvolti nella patogenesi dell'OA e quindi nuovi target farmacologici. Infine, qualora l'inattivazione di iRhom2 portasse ad un miglioramento della malattia, progettiamo di brevettare al più presto iRhom2 come target.

CONFERENZE

- Brainstorming in Metalloproteinases, Online Meeting, 21.10.2020
- British Society for Matrix Biology (BSMB) Autumn Meeting, University of East Anglia, Norwich, UK (Presentazione Orale).
- Gordon Research Conference (GRC) in metalloproteinases, Il Ciocco Resort, Lucca (Italia) (Presentazione Poster).

PUBBLICAZIONI

- Carreca AP, Pravatà VM, Markham M, Bonelli S, Murphy G, Nagase H, Troeberg L, Scilabra SD. TIMP-3 facilitates binding of target metalloproteinases to the endocytic receptor LRP-1 and promotes scavenging of MMP-1. *Sci Rep.* 2020 Jul 21;10(1):12067. doi: 10.1038/s41598-020-69008-9. PMID: 32694578; PMCID: PMC7374751.
- Yang, C.Y., L. Troeberg, and S.D. Scilabra, Quantitative Mass Spectrometry-Based Secretome Analysis as a Tool to Investigate Metalloprotease and TIMP Activity. *Methods Mol Biol.* 2020. 2043: p. 265-273.
- Interleukin 13 (IL-13)-regulated expression of the chondroprotective metalloproteinase ADAM15 is reduced in aging cartilage. C. Y. Yang, A. Chanalaris, S. Bonelli, O. McClurg, G. L. Hiles, A. L. Cates, J. Miotla Zarebska, T L Vincent, M L Day, S A Müller, S F Lichtenthaler, H Nagase, S D Scilabra, L Troeberg. *Osteoarthritis Cartil Open* 2020 Vol. 2 Issue 4 Pages 100128
- Calligaris M, Cuffaro D, Bonelli S, Spanò DP, Rossello A, Nuti E, Scilabra SD. Strategies to Target ADAM17 in Disease: From its Discovery to the iRhom Revolution. *Molecules.* 2021 Feb 10;26(4):944.

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

Simone Dario Scilabra, PhD
sdscilabra@fondazionerimed.com

COLLABORAZIONI

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

AREA TERAPEUTICA

Oncologia

PIPELINE



BREVE DESCRIZIONE

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

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

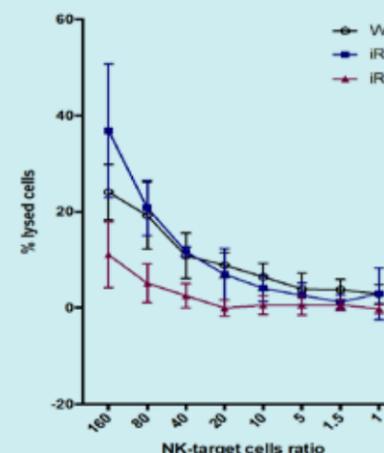
IMPATTO

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

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

RISULTATI RAGGIUNTI NEL 2020

Sebbene questo progetto sia ancora ai suoi inizi, sono già stati ottenuti una serie di risultati fondamentali per il suo avanzamento. In aggiunta ai risultati preliminari che stanno alla base di questo progetto e che sono descritti nel precedente paragrafo, nel 2020 abbiamo avviato una serie di collaborazioni e completato alcune misure necessarie per portare avanti il progetto in maniera positiva. Innanzitutto, abbiamo formalizzato il "Material Transfer Agreement"



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

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

OBIETTIVI PER IL 2021

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

PUBBLICAZIONI

- Calligaris M, Cuffaro D, Bonelli S, Spanò DP, Rossello A, Nuti E, Scilabra S.D. Strategies to Target ADAM17 in Disease: From its Discovery to the iRhom Revolution. *Molecules*. 2021 Feb 10;26(4):944.



INGEGNERIA DEI TESSUTI E DISPOSITIVI MEDICI

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

Le piattaforme di Bioingegneria e Ingegneria dei tessuti sono dotate di strutture che consentono la sintesi e la caratterizzazione di biomateriali e *scaffold* per applicazioni di ingegneria tissutale e la progettazione, lo sviluppo e la convalida preclinica di nuovi dispositivi medici.

Sono in corso di studio nuovi approcci per la caratterizzazione di tessuti biologici e biomateriali e per la fabbricazione di *scaffold*. Importanti sviluppi anche nella valutazione preclinica, *in vitro* ed *in vivo*, di soluzioni cardiovascolari innovative, che includono *patch* cardiaci ingegnerizzati e nuove valvole cardiache realizzate mediante polimeri biostabili, tessuti ingegnerizzati o applicazioni di ingegneria genetica.

Nel 2020 il progetto "BIOMITRAL" di Antonio D'Amore, Group Leader in Ingegneria Tissutale della Fondazione Ri.MED, si è aggiudicato il "Consolidator Grant" del Consiglio Europeo della Ricerca e la Fondazione è stata eletta quale *host institution* per lo sviluppo del progetto, che sarà avviato nel corso del 2021.

La possibilità di sviluppo e validazione *in house* di soluzioni cliniche, unitamente alla collaborazione con i maggiori centri nel territorio, faciliterà l'introduzione delle innovazioni nella pratica clinica.

Courtesy of Dr Arianna Adamo
Tissue Engineering Group - Fondazione Ri.MED

Sviluppo di bio-adesivi non tossici per ambienti acquosi

Caterina Alfano, PhD

Sviluppo di una valvola cardiaca transcateretere innovativa

Gaetano Burriesci, PhD

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

Gaetano Burriesci, PhD

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

Gaetano Burriesci, PhD

Simulazioni numeriche Smoothed Particle Hydrodynamics (SPH) per applicazioni di bioingegneria cardiovascolare

Gaetano Burriesci, PhD

Caratterizzazione termomeccanica di biomateriali superelastici Ni-Ti

Gaetano Burriesci, PhD

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

Antonio D'Amore, PhD

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

Antonio D'Amore, PhD

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

Antonio D'Amore, PhD

Parete di miocardio ingegnerizzata (TECP)

Antonio D'Amore, PhD

Valvole cardiache ingegnerizzate (TEHV)

Antonio D'Amore, PhD

Vasi sanguigni ingegnerizzati (TEVG)

Antonio D'Amore, PhD

R-CaRe - Riabilitazione per la rigenerazione della Cartilagine

Riccardo Gottardi, PhD

Sviluppo di uno *scaffold* ingegnerizzato iperelastico per la rigenerazione dell'entesi tendinea

Riccardo Gottardi, PhD

Sviluppo di bio-adesivi non tossici per ambienti acquosi

Caterina Alfano, PhD
calfano@fondazionerimed.com

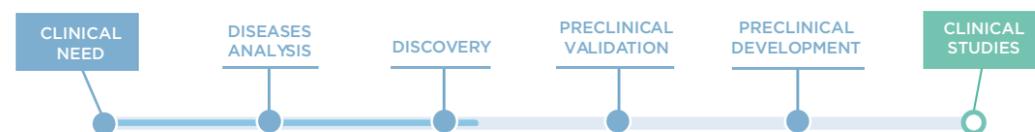
COLLABORAZIONI

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

AREA TERAPEUTICA

Insufficienze d'organo

PIPELINE



BREVE DESCRIZIONE

Gli animali sessili marini hanno sviluppato strategie adattive per superare gli ostacoli che inibiscono la loro adesione alle superfici marine in acqua (pH, strati di idratazione e proprietà dielettriche). Ciò ha reso questi animali potenziali fonti di adesivi biocompatibili applicabili in chirurgia, medicina rigenerativa e ingegneria dei tessuti. Tra gli organismi marini in grado di secernere prodotti adesivi, i mitili hanno ricevuto particolare attenzione per la loro capacità di aderire saldamente ai loro substrati anche in condizioni di marea turbolenta. L'adesione dei mitili è possibile attraverso la secrezione di filamenti (bisso) a base di proteine che maturano nel piede del mitilo (*Mussel foot proteins*, Mfps). Molti sforzi sono stati fatti per

creare polimeri bioadesivi in grado di imitare le proprietà delle Mfps, ma finora senza successo. Ulteriori studi sono necessari per colmare la mancanza di una completa comprensione del meccanismo che presiede l'adesione in Mfps. In particolare, non ci sono informazioni strutturali su alcuna proteina Mfp, e di conseguenza manca una completa comprensione della relazione struttura/funzione per queste proteine. Il nostro obiettivo è caratterizzare la struttura di Mfps in modo da identificare i residui chiave coinvolti nel processo di adesione e utilizzare queste informazioni per derivare proteine ingegnerizzate biocompatibili da utilizzare come bioadesivi in applicazioni di chirurgia, medicina rigenerativa e ingegneria dei tessuti.

IMPATTO

Lo sviluppo di nuovi adesivi di derivazione naturale ha un grande impatto in settori quali l'ingegneria dei tessuti, l'impianto di dispositivi medici, la medicina rigenerativa e la chirurgia. Ci sono infatti situazioni in cui le tecniche più tradizionali come la sutura sono impraticabili e l'uso di adesivi diventa particolarmente cruciale. La grande sfida nello sviluppo di nuove molecole bioadesive è trovare molecole in grado di far aderire i tessuti in modo efficiente in ambienti acquosi e ostili. Lo sviluppo di proteine ingegnerizzate ispirate a quelle di animali sessili con proprietà adesive in acqua, potrebbe superare queste difficoltà. Tali proteine hanno inoltre la grande potenzialità di essere biodegradabili, solitamente non tossici per il corpo umano e non suscitano facilmente una forte risposta immunitaria.

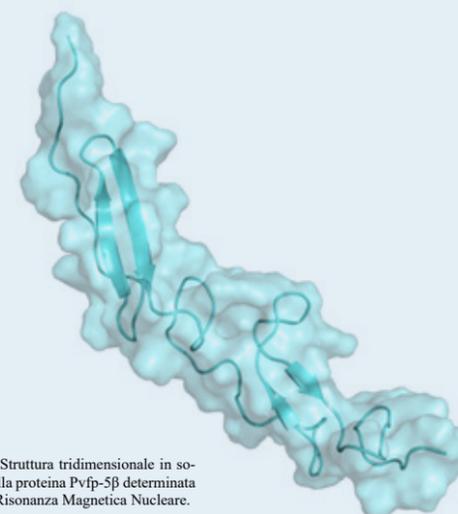


Figure 1: Struttura tridimensionale in soluzione della proteina Pvfp-5β determinata mediante Risonanza Magnetica Nucleare.

RISULTATI RAGGIUNTI NEL 2020

Recenti studi hanno dimostrato che tra le Mfps recentemente identificati nella cozza verde asiatica *Perna viridis*, la proteina di tipo 5β (Pvfp-5β) viene secreta per prima e quindi si è ipotizzato che questa proteina sia la prima ad avviare il processo di adesione con il substrato marino. Negli ultimi anni abbiamo messo a punto un protocollo per la produzione di Pvfp-5β ricombinante e questo ci ha permesso quest'anno di finalizzare la prima struttura di una Mfp e di indagare le sue proprietà dinamiche in soluzione mediante risonanza magnetica nucleare (Fig.1).

La struttura della Pvfp5-β determinata mediante NMR è coerente con i nostri precedenti dati di spettrometria di massa e conferma l'elevata omologia con due motivi EGF in tandem. La struttura mostra che la proteina è un monomero allungato prevalentemente dominato da regioni *random coil* ed include due fogli β antiparalleli tenuti insieme dalla presenza di cinque ponti disolfuro. Nonostante l'abbondanza di segmenti *random coil*, i dati suggeriscono che PVFP-5β è ben ordinata e rigida, come confermato dai dati NMR di rilassamento (T1, T2 e HetNOE) che mostrano fluttuazioni nell'ordine dei pico- nano- secondi. I residui amminoacidi chiave come Tyr, Lys e Arg, risultano ben esposti sulla superficie della proteina, quindi pronti per il contatto con altre superfici. Questa rappresenta la prima intuizione strutturale per razionalizzare le proprietà adesive delle Mfps.

OBIETTIVI PER IL 2021

Nel breve termine, ci proponiamo di effettuare un confronto dettagliato delle proprietà della Pvfp-5β ricombinante con quelle della proteina nativa in cui i residui di tirosina risultano modificati in dopamina. Intendiamo dunque mettere a punto la reazione enzimatica per produrre Pvfp-5β modificata con dopamina e successivamente determinarne la sua struttura tridimensionale mediante risonanza magnetica nucleare. Verranno inoltre testate la biodegradabilità e le proprietà meccaniche delle due forme di Pvfp-5β.

PUBLICATIONS

- Astoricchio E., Alfano C., Rajendran L., Temussi P., Pastore A. (2020) The Wide World of Coacervates: From the Sea to Neurodegeneration. Trends Biochem Sci, 45(8):706-717.
- Puglisi R., Brylski O., Alfano C., Martin S.R., Pastore A., Temussi P. (2020) Quantifying the thermodynamics of protein unfolding using 2D NMR spectroscopy. Comm Chemistry, doi: 10.1038/s42004-020-00358-1.
- Morando M.A., Venturella F., Monaca E., Sabbatella R., Rosa Pasantino, Pastore A., Alfano C. Solution NMR structure of recombinant Pvfp-5β reveals key residues involved in adhesion. Under preparation.

Sviluppo di una valvola cardiaca transcateretere innovativa

Gaetano Burriesci, PhD
gburriesci@fondazionerimed.com



COLLABORAZIONI

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

AREA TERAPEUTICA

- Insufficienze d'organo
- Patologie dell'invecchiamento

PIPELINE



BREVE DESCRIZIONE

La sostituzione chirurgica della valvola aortica, che in passato ha rappresentato un trattamento efficace, è sempre meno adatta alla classe di pazienti emergenti. Infatti, la più comune malattia valvolare consiste ormai nella stenosi aortica degenerativa dovuta a calcificazione senile, che interessa oltre il 10% degli anziani di età superiore ai 75 anni. A causa dell'età dei pazienti, questa condizione è spesso associata a patologie concomitanti e chirurgia pregressa, fattori che aumentano drasticamente i rischi di mortalità operatoria. Di conseguenza, circa un terzo dei pazienti anziani con stenosi aortica sintomatica viene attualmente escluso dalla pratica chirurgica; e questo numero è in rapido aumento a causa della crescente longevità della popolazione.

L'impianto transcateretere della valvola aortica (TAVI) rappresenta una soluzione ideale per le esigenze di questo gruppo di pazienti, in quanto consente di impiantare una protesi valvolare nel sito anatomico per via percutanea, evitando la chirurgia a cuore aperto e i rischi a questa associati. L'esperienza clinica con questo nuovo approccio ne ha chiaramente dimostrato i benefici clinici, evidenziando al contempo la necessità di sostanziali miglioramenti per aumentare la sicurezza e l'efficacia del trattamento. Questo progetto prevede lo sviluppo e la qualificazione preclinica di una nuova valvola aortica protesica adatta per l'impianto TAVI, che supererebbe i principali limiti sperimentati delle soluzioni attualmente disponibili.

IMPATTO

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

RISULTATI RAGGIUNTI NEL 2020

È stata progettata e realizzata una nuova versione chirurgica della valvola TRISKELE, poi impiantata con successo in due ovini, che hanno raggiunto le attese di sopravvivenza di 90 giorni (come richiesto dalla normativa Europea). I gradienti di pressione transvalvolare, la velocità sanguigna e l'effective orifice area sono rimasti buoni e stabili per entrambi gli animali, dall'impianto fino al loro sacrificio. Per l'intero periodo di vita post-impianto, non è stato rilevato nessun segno di flusso turbolento né alterazione alcuna del movimento dei lembi, ed il rigurgito si è mantenuto minimo o irrilevabile. La tolleranza locale del materiale dei lembi si è dimostrata eccellente, con nessuna cellula infiammatoria osservabile prodotta sul materiale valvolare. Non sono stati rilevati depositi minerali (verifica con HE&S e Alizarin Red), né batteri (verifica con HE&S e Gram) in nessuna delle sezioni esaminate. I valori di emoglobina plasmatica libera si sono mantenuti entro l'intervallo di riferimento in ogni misurazione. Pertanto, la valvola ha confermato il suo potenziale ad emergere come un nuovo dispositivo che consenta maggiore sicurezza operativa, procedure di fabbricazione ed impianto semplificate e costi ridotti.

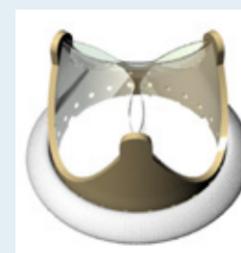
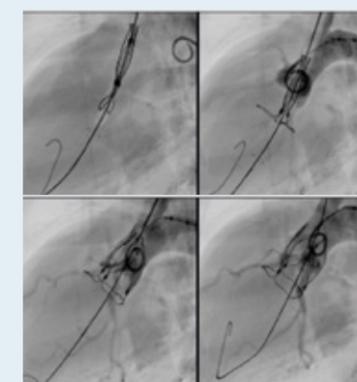


Immagine della valvola transcateretere TRISKELE



Sequenza di impianto del dispositivo

OBIETTIVI PER IL 2021

La prossima fase in questo progetto comporterà l'istituzione di partnership con industrie cardiovascolari e/o ventures capital firm, per finalizzare lo sviluppo del dispositivo e favorirne l'introduzione sul mercato. In particolare, la sintesi del materiale dei lembi verrà ottimizzata ed industrializzata, richiedendo test e la verifica delle sue proprietà. In parallelo, si inizierà ad implementare un impianto di produzione per le valvole. Il *delivery system* dovrà essere riprogettato per adattarlo alla produzione industriale, e si inizierà a pianificare la fase di valutazione su animale.

La collaborazione con aziende biomedicali consolidate semplificherà anche la verifica degli aspetti non clinici (durata a magazzino, imballaggio, accessori, ecc.), la compilazione dei dossier di progetto e l'organizzazione della fase clinica per completare con successo il trasferimento tecnologico.

PUBBLICAZIONI

- Rahmani, B., Burriesci, G. (2020) Polymeric Heart Valves. In: Roberts G., Watts A., European Biophysical Societies (eds) Encyclopedia of Biophysics. Springer, Berlin, Heidelberg. https://doi.org/10.1007/978-3-642-35943-9_702-1

PROPRIETÀ INTELLETTUALE

- Burriesci, G., Tzamtzis, S., Seifalian, A. M. (2017) Prosthesis delivery system. Patent US9597211 B2
- Burriesci, G., Bozkurt, S., Rahmani, B., Mullen, M.J. (2018) Prosthesis heart valve. Patent US2018161155 A1
- Burriesci, G., Bozkurt, S., Rahmani, B., Mullen, M.J. (2018) Prosthesis heart valve. Patent EP3310301 A1
- 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
- Burriesci, G., Seifalian, A. M., Zervides, C. (2017) Heart Valve Prosthesis. Patent EP2413842 B1
- Burriesci, G., Bozkurt, S., Rahmani, B., Mullen, M.J. (2016) Prosthetic heart valve. Application Number: WO2016203241 A1
- Burriesci, G., Tzamtzis, S., Seifalian, A. M. (2012) Prosthesis delivery system. Patent WO2012052718
- Burriesci, G., Seifalian, A. M., Zervides, C. (2010) Heart valve prosthesis. Patent WO2010112844 A1

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

Gaetano Burriesci, PhD
gburriesci@fondazionerimed.com

COLLABORAZIONI

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

AREA TERAPEUTICA

Insufficienze d'organo

PIPELINE



BREVE DESCRIZIONE

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

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

IMPATTO

Ogni anno vengono eseguite nel mondo circa 300 000 sostituzioni di valvole cardiache. Le tipologie di protesi disponibili si distinguono in due categorie principali, le valvole meccaniche, che richiedono una terapia anticoagulante cronica, e le valvole biologiche. Quest'ultime utilizzano lembi biologici normalmente estratti dalle valvole cardiaca umane o suine, o realizzate utilizzando pericardio animale. Le valvole cardiache biologiche sono preferibili nei pazienti più anziani (> 65 anni), dove risultano più durevoli. Al contrario, i soggetti più giovani ricevono solitamente valvole cardiache meccaniche, in quanto le valvole cardiache biologiche vi cederebbero rapidamente per via di meccanismi legati all'età. In particolare, nel 100% dei pazienti di età inferiore ai 35 anni, viene riportato un livello critico di deterioramento strutturale entro 5 anni dall'impianto. Questo progetto offrirebbe valvole cardiache biologiche durevoli anche ai pazienti più giovani, migliorandone la qualità del trattamento ed eliminando la necessità di sottoporli a terapie anticoagulanti permanenti. Ciò consentirebbe di estendere l'accesso a questa cura più rispettosa della fisiologia umana ad un numero più vasto di individui.

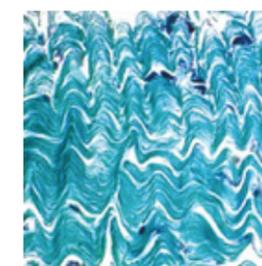
RISULTATI RAGGIUNTI NEL 2020

Cinque valvole realizzate con pericardio suino Gal-knockout (GalKO) e cinque valvole realizzate con l'equivalente standard sono state impiantate in modelli ovin per 90 giorni. Le prestazioni emodinamiche delle valvole sono state verificate con cadenza mensile. Dopo l'espianto, le valvole sono state esaminate macroscopicamente e microscopicamente per verificare la formazione di pannus, vegetazioni, infiammazioni, e la presenza

di trombi e calcificazioni. La calcificazione è stata ulteriormente analizzata mediante raggi-X e spettroscopia atomica quantitativa. I dati ecocardiografici non hanno indicato alcuna differenza tra i due gruppi esaminati, e tutti gli animali hanno dimostrato prestazioni emodinamiche eccellenti senza disfunzioni correlate alla valvola. All'esame delle protesi espantate è stata rilevata una lieve integrazione nel pannus, e presenza minima di trombi e depositi, senza differenze tra i due gruppi. Nessun animale ha mostrato segni di infezione, vegetazione, infiammazione dei tessuti o degenerazione strutturale della valvola. Ciò indica che la mutazione nei suini GalKO non ha alcun impatto biologico avverso, ed il pericardio GalKO è adatto all'impiego clinico in valvole cardiache biologiche.

OBIETTIVI PER IL 2021

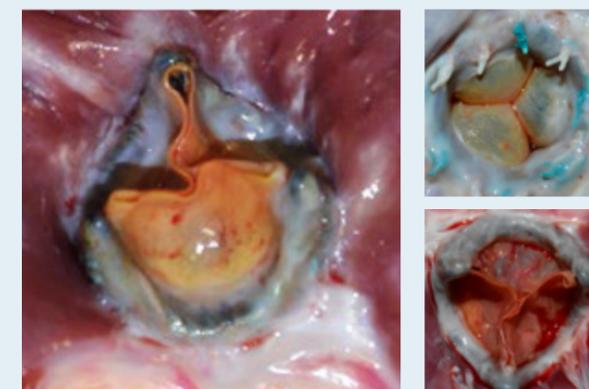
Si esaminerà in futuro la possibilità di utilizzare tessuti di altre specie animali geneticamente modificate, come il pericardio bovino, che offre un'esperienza clinica ben più estesa rispetto quello suino. Si verificherà inoltre la possibilità di passare alla fase preclinica con i dispositivi precedentemente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



Microstruttura del pericardio suino con inibizione dell'α1,3-galattosiltransferasi



Prototipo della valvola realizzata in pericardio suino transgenico



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

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

Gaetano Burriesci, PhD
gburriesci@fondazionerimed.com



COLLABORAZIONI

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



AREA TERAPEUTICA

- Insufficienze d'organo
- Patologie dell'invecchiamento

PIPELINE



BREVE DESCRIZIONE

La fibrillazione atriale (FA) è una patologia caratterizzata da una contrazione irregolare del muscolo cardiaco. A causa degli eventi tromboembolici correlati, la FA può portare a gravi complicazioni come ictus, attacchi ischemici transitori (TIA) e demenza. Il 90% di questi eventi ha origine nell'appendice atriale sinistra, una sacca di tessuto muscolare che protrude dall'atrio sinistro (AS). Il problema è stato recentemente studiato da numerosi gruppi di ricerca, che hanno focalizzato la loro attenzione sul ruolo della morfologia dell'appendice. Tuttavia, le cause ed i meccanismi responsabili del fenomeno tromboembolico restano

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

A tale progetto partecipano le dottoresse **Alessandra Monteleone** e **Danila Vella** (Ri.MED) e l'Ing. **Giulio Musotto** (Ri.MED e Università degli Studi di Palermo).

IMPATTO

La letteratura attualmente disponibile è focalizzata sull'analisi del ruolo della morfologia dell'appendice (questa è estremamente variabile da paziente a paziente) sulla formazione di trombi. Tali studi si basano su modelli a parete rigida, che trascurano le alterazioni nella contrattilità delle pareti muscolari prodotti dalla fibrillazione. In questo progetto, invece, vengono applicati approcci di fluidodinamica computazionale per modellare il contributo del movimento delle pareti dell'appendice in condizioni sane e patologiche. Lo studio indica chiaramente che le contrazioni dell'appendice atriale sinistra sono un fattore funzionale essenziale al mantenimento di una fluidodinamica ottimale. La loro compromissione emerge come il fattore principalmente responsabile per instaurare condizioni di flusso generalmente responsabili per la formazione di trombi.



RISULTATI RAGGIUNTI NEL 2020

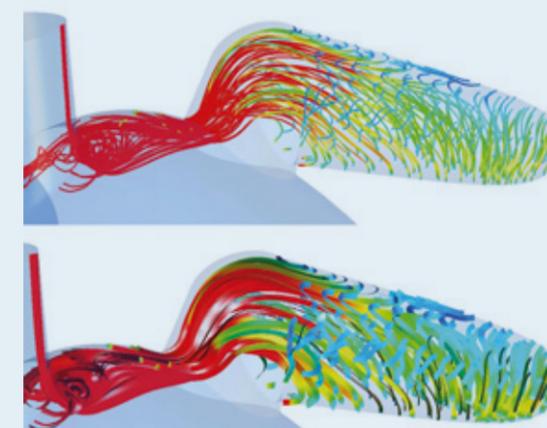
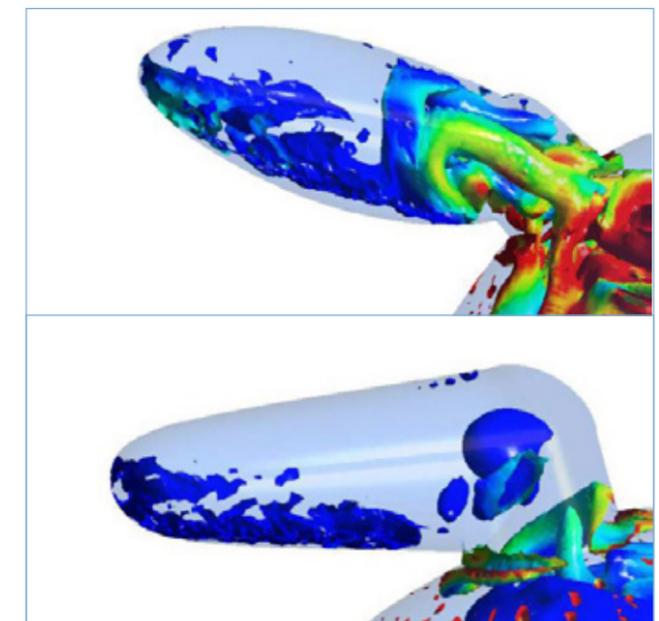
Al fine di esaminare l'effetto delle alterazioni prodotte dalla FA, sono stati sviluppati due modelli numerici dell'atrio sinistro idealizzati, includenti la più comune morfologia dell'appendice atriale. Quindi sono state simulate condizioni di contrattilità regolare e fibrillante, mediante applicazione della relativa motilità muscolare alle pareti atriale e dell'appendice. I diversi scenari sono stati analizzati e confrontati in termini di velocità, di deformazione di taglio e vorticità prodotte nelle diverse regioni dell'appendice. Lo studio ha chiaramente indicato che le alterazioni nella contrattilità prodotte dalla FA sono un fattore predominante nell'istaurare condizioni emodinamiche associate ad una maggiore incidenza di eventi ischemici, coerentemente con l'evidenza clinica. Questo contributo, comunemente trascurato negli studi numerici presenti in letteratura, deve essere invece incorporato per modellare un flusso realistico ed indicativo. Si è osservato inoltre che il progressivo allargamento delle camere cardiache che si verifica nei pazienti soggetti fibrillazione atriale può amplificare gli effetti

peggiorativi, confermando che anche le variazioni morfologiche rilevanti che caratterizzano l'appendice nei vari soggetti possono avere un ruolo significativo.

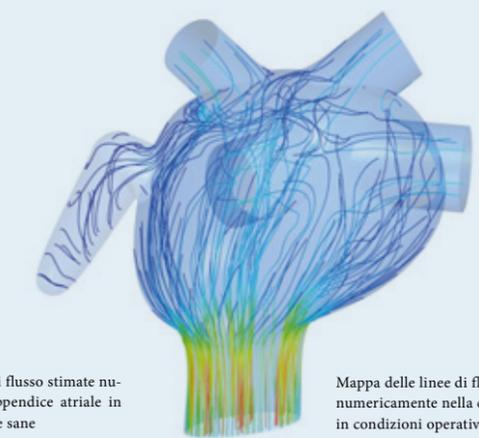


OBIETTIVI PER IL 2021

Il modello attualmente realizzato si basa su una serie di ipotesi, come la descrizione laminare newtoniana del sangue e l'uso di un'anatomia semplificata/generalizzata. In seguito, verrà esaminato il contributo delle anatomie specifiche del paziente, adottando un approccio che meglio modella i movimenti fisiologici, simulando la contrazione muscolare piuttosto che imponendo spostamenti alle pareti del modello. A tal fine la geometria del modello verrà modificata integrando parametri morfologici patient specific e l'attivazione contrattile della parete dell'appendice.



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



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

Simulazioni numeriche Smoothed Particle Hydrodynamics (SPH) per applicazioni di bioingegneria cardiovascolare

Gaetano Burriesci, PhD
gburriesci@fondazionerimed.com



COLLABORAZIONI

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



AREA TERAPEUTICA

- Insufficienze d'organo
- Patologie dell'invecchiamento

PIPELINE



BREVE DESCRIZIONE

La trombosi è una patologia che comporta la formazione di trombi che ostruiscono le arterie e, in particolari condizioni, possono essere trasportati nel sistema cardiocircolatorio causando infarto del miocardio, ictus o embolia polmonare. Si tratta di un processo molto complesso e non del tutto compreso a causa della compartecipazione di diversi fattori tra cui l'attivazione e l'aggregazione piastrinica, le interazioni chimiche tra i reagenti coinvolti e l'effetto dell'emodinamica. Dal momento che le soluzioni analitiche risultano spesso inadeguate e difficilmente risolvibili, la ricerca sta evolvendo sem-

pre più verso l'utilizzo di metodi computazionali grazie ai progressi nell'elaborazione computazionale. Questo studio mira all'analisi della formazione, crescita ed evoluzione del trombo tramite un metodo numerico a particelle denominato Smoothed Particle Hydrodynamics (SPH) accoppiato ad un modello di interazione fluido struttura (FSI). A differenza dei tradizionali e ben più utilizzati metodi euleriani, il metodo SPH, grazie alla sua natura meshless e lagrangiana, si presta molto bene a catturare realisticamente l'interazione multifisica tra flusso sanguigno e trombi.

IMPATTO

La trombosi è un problema rilevante nella progettazione ed implementazione di protesi cardiovascolari ed organi artificiali. Il maggiore ostacolo per la prevenzione e il trattamento di questa patologia è la scarsa conoscenza dei meccanismi coinvolti. Lo studio dell'emodinamica può offrire delle indicazioni essenziali sulla prevenzione del rischio da trombosi. Questo progetto di ricerca mira a sviluppare uno strumento numerico ad elevato potenziale nella diagnosi e nel trattamento di malattie cardiovascolari, simulando sia l'effetto dell'emodinamica che la formazione del trombo. In futuro, utilizzando modelli patient-specific, questo strumento diagnostico potrebbe dare delle indicazioni per lo sviluppo di nuovi dispositivi, valutandone le prestazioni e i rischi, ed indicandone i possibili miglioramenti prima di un eventuale realizzazione prototipale. Inoltre, la simulazione di patologie (quali ad esempio la fibrillazione atriale) permetterebbe di fornire ulteriori chiarimenti e/o indicazioni per la loro prevenzione e cura.



RISULTATI RAGGIUNTI NEL 2020

Tra i risultati raggiunti nel corso del 2020, è opportuno sottolineare l'implementazione ed integrazione di diversi moduli nel codice open-source SPH Panormus (sviluppato presso l'università degli Studi di Palermo). In particolare, è stato introdotto un modulo riguardante la meccanica strutturale, che adesso consente di rappresentare il solido e la sua risposta meccanica. Tale modello strutturale è stato quindi accoppiato con la dinamica dei fluidi descritta con il metodo SPH, realizzando un approccio FSI. È stato quindi introdotto un nuovo modello reologico non-Newtoniano per il sangue basato sulla descrizione di Casson; muovendo i primi passi per la modellazione della formazione del trombo. Considerando quest'ultimo aspetto, la crescita temporale del valore di viscosità viene interpretato come un parametro chiave nei cambiamenti emodinamici che precedono la formazione del coagulo.



OBIETTIVI PER IL 2021

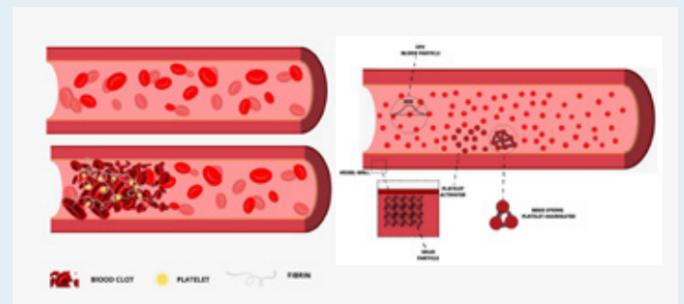
I passi programmati per il progetto di ricerca riguarderanno l'approfondimento dei moduli già implementati nel codice SPH per la modellazione del processo di coagulazione del sangue. Verrà integrato l'approccio FSI, precedentemente testato e validato per l'aggregazione delle particelle. Inoltre, sarà introdotta la modellazione delle reazioni biochimiche delle diverse specie in gioco, tramite l'utilizzo delle equazioni di diffusione e avvezione. Completato questo stadio sarà quindi possibile studiare anche l'effetto dell'introduzione di un agente anticoagulante. Queste reazioni saranno quindi legate con l'evoluzione delle forze di attrazione interna del solido, per poter valutare la trasformazione di questo nel tempo. Il modello sarà inoltre testato con casi di riferimento presenti in letteratura e successivamente applicato per rappresentare situazioni reali più complesse come malfunzionamenti di valvole cardiache o stenosi arteriose.



Figura: evoluzione nel tempo di un gel (regione marrone in figura) immerso nel sangue (regione rossa). Il gel, che rappresenta il primo stadio di formazione del trombo, è stato modellato come un fluido a viscosità aumentata.

Inoltre, l'accoppiamento con FSI permette di studiare l'aggregazione piastrinica mediante lo sviluppo di forze di attrazione interna tra particelle. La concentrazione delle diverse specie bio-chimiche coinvolte nel processo può essere descritta attraverso equazioni di diffusione-avvezione.

A tale progetto partecipano le dottoresse **Alessandra Monteleone** (Ri.MED) ed **Alessia Viola** (Ri.MED e Università degli Studi di Palermo).



Caratterizzazione termomeccanica di biomateriali superelastici Ni-Ti

Gaetano Burriesci, PhD
gburriesci@fondazionerimed.com

COLLABORAZIONI

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

AREA TERAPEUTICA

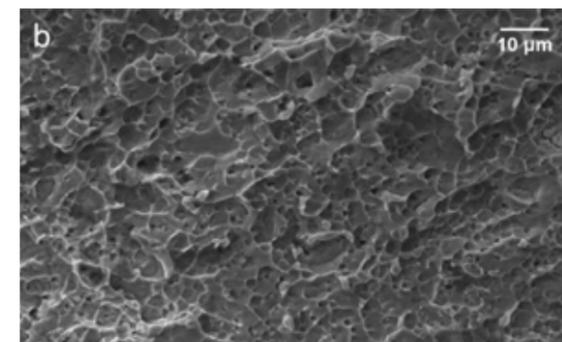
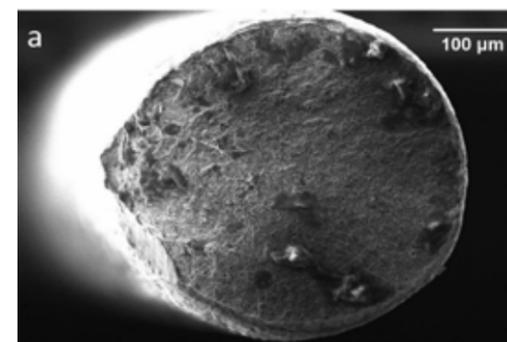
- Insufficienze d'organo
- Patologie dell'invecchiamento



BREVE DESCRIZIONE

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

A tale progetto partecipa l'Ing Sofia Di Leonardo (Ri.MED e Università degli Studi di Palermo).



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

IMPATTO

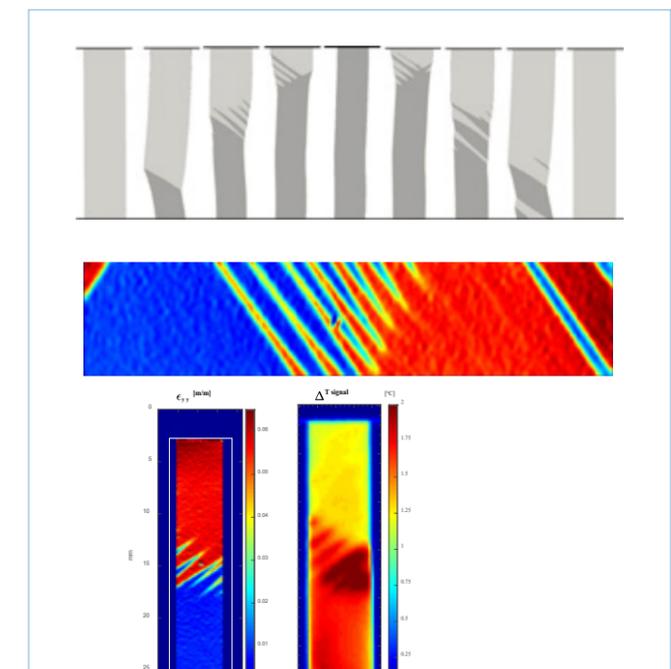
Una migliore comprensione e caratterizzazione del comportamento del nitinol possono contribuire ad accrescere la sicurezza dei dispositivi medici basati su questo materiale. L'implementazione combinata delle tecniche ottiche di correlazione delle immagini digitali e della termografia a infrarossi, sperimentata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

RISULTATI RAGGIUNTI NEL 2020

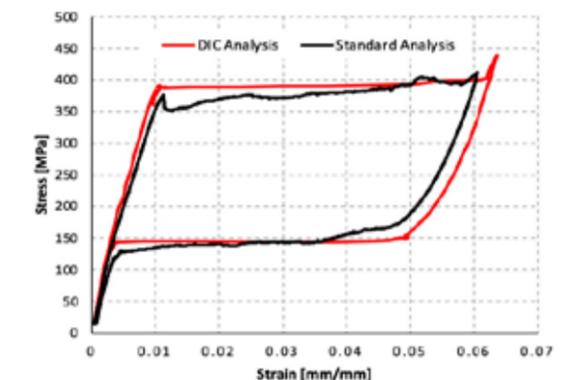
Le principali fonti di errore che influenzano l'affidabilità dei test di trazione uniaxiali standard per la caratterizzazione meccanica del nitinol sono state identificate e analizzate. In particolare, la trasformazione indotta da stress, responsabile del comportamento superelastico, causa anche l'insorgenza di disomogeneità locali nel provino, associate alla formazione di bande di Lüders, deformazioni laterali e momenti flettenti spuri sovrapposti al carico di trazione. Questi fenomeni limitano l'affidabilità dei metodi di caratterizzazione standard nel determinare parametri sufficientemente accurati per una descrizione adeguata del materiale e per lo sfruttamento ottimale delle sue caratteristiche. L'analisi mediante *digital image correlation* (DIC), consentendo una rilevazione a campo intero dei provini di test, può contribuire a superare questi limiti. L'approccio implementato fornisce una caratterizzazione sostanzialmente più accurata del materiale, necessaria per supportare la selezione della lega e dei trattamenti termomeccanici cui può essere sottoposta nella realizzazione di protesi impiantabili. Ciò può contribuire a raggiungere livelli di sicurezza ed efficacia più elevati nelle applicazioni critiche in cui viene impiegato il nitinol.

OBIETTIVI PER IL 2021

Al fine di sviluppare ulteriormente la metodologia implementata, verrà integrata l'analisi delle tensioni termoelastica (TSA), comunemente utilizzata per correlare la variazione di temperatura alla variazione di stress nei materiali convenzionali, mediante l'esame del segnale di fase dell'effetto termoelastico. L'approccio implementato sarà quindi utilizzato per effettuare la caratterizzazione termo-meccanica di dispositivi medici complessi, ottenendo la mappa delle sollecitazioni a campo intero, a partire dalle mappe di temperatura e deformazione. Ciò consentirà l'identificazione delle regioni sottoposte a sollecitazioni meccaniche critiche, fornendo uno strumento indispensabile per l'analisi sperimentale dei prototipi di protesi cardiovascolari e per la loro ottimizzazione.



Mappe delle deformazioni (sinistra) e della variazione termica reversibile (destra) acquisite da un provino di nitinol sottoposto a cicli di carico di trazione



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

Antonio D'Amore, PhD
adamore@fondazionerimed.com

COLLABORAZIONI

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

AREA TERAPEUTICA

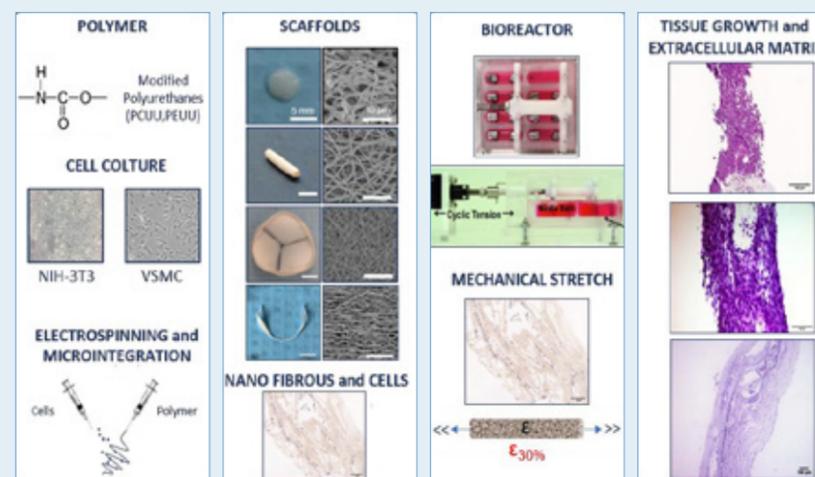
- Insufficienze d'organo
- Patologie dell'invecchiamento
- Oncologia

PIPELINE



BREVE DESCRIZIONE

Tema: modelli elastomerici *in vitro* per lo studio della mecano-biologia dei tessuti molli. Tre macro aree, rilevanti per la comprensione della riparazione dei tessuti e formazione di tessuto *de novo*, restano ancora oggetto di studio: I) modelli meccanici e lo loro capacità predittiva delle correlazioni tra la macro scala e la meso-micro scala, II) modelli di crescita tissutale e della sua relazione con i carichi meccanici e le deformazioni, III) modelli di degradazione di materiale *in vivo* e della sua relazione con le carichi meccanici e le deformazioni. La linea di ricerca BE-ECM, integrata con le linee NET-IBA e NET-MTG, si prefigge di dare nuove risposte su questi tre differenti fronti introducendo e perfezionando modelli fisici semplificati di crescita tissutale, attività cellulare e degradazione di materiale.



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

IMPATTO

- I principali risvolti di questa ricerca riguardano i progressi su:
- Simulazione di crescita endogena su *scaffold* ingegnerizzati sottoposti a carico meccanico o deformazione alla scala dell'organo;
 - Simulazione di degradazione *in vivo* di *scaffold* ingegnerizzati;
 - Studio dell'impatto di segnali topologici e meccanici sull'elaborazione di ECM.
 - Studio del cell signaling e dell'attività biochimica delle cellule a contatto con i biomateriali.

L'uso di questi modelli *in vitro* consente di ampliare la conoscenza della mecano-biologia dei biomateriali progettati e consente di verificare, sebbene su sistemi semplificati, efficacia di diverse strategie di ingegneria di tessuto. Esempi di tali strategie includono: regimi di condizionamento per accelerare la crescita tissutale, modulazione dei profili di degradazione, orientare o influenzare la differenziazione cellulare.

RISULTATI RAGGIUNTI NEL 2020

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) e chordae tendineae bioingegnerizzate (BECT), utilizza bioreattori a carico uniassiale e poliuretani degradabili (e.g. PEUU, PCUU, PECUU) micro-integrati con cellule via electro-spray. L'obiettivo raggiunto nel 2020 è stato quello di rispondere a domande fondamentali riguardanti i meccanismi di trasduzione di carico *in vivo* utilizzando sistemi semplificati di sintesi di matrice extracellulare *in silico*. Permutazioni di questo concetto hanno concesso di:

- individuare un nuovo meccanismo per incrementare la formazione di ECM a parità di carico meccanico di macro scala, principio applicabile a: TECP, TEVG e BECT;
- implementare apparato di condizionamento meccanico di corde tendinee;
- implementare apparato per indurre degradazione accelerata di valvole cardiache polimeriche;
- individuare il regime di condizionamento per BECT in grado di riprodurre massa e proprietà meccaniche delle corde tendinee native

Attività di docenza

- Mentor for the Institute for Clinical Research Education (ICRE). Career development program training the next generation of clinical and translational scientists, Univ. of Pittsburgh. Trainee: Casey, Tompkins-Rhoades, 2020;
- Guest lecturer for the biomedical engineering master of science and PhD program, BIOENG 2810 - Biomaterials & biocompatibility. Department of bioengineering, University of Pittsburgh. Title: "A brief overview on polymers processing methods for soft tissue engineering";
- Guest lecturer for the biomedical engineering master of science and PhD program, MSCMP 3735 - Extracellular matrix in tissue biology and bioengineering. Department of bioengineering, University of Pittsburgh. Title: "Cardiac ECM: structure - function, damage mechanism, and tissue engineering approaches to facilitate constructive remodeling".

Attività di tutoraggio

- A. Adamo, PhD candidate, University of Palermo Italy, engineering chordae tendineae, mechanical conditioning and mechano-biology.

Lezioni su invito

- "Ri.MED cardiac tissue engineering program, an overview to foster joint proposal applications", Monzino Cardiology Center, Milan, December 1st 2020;
- "Advancing Bioinspired polymer processing: how improved control over biomaterial structure-function can facilitate translation", school of engineering Polytechnic University of Turin, Turin, December 17th 2020.

OBIETTIVI PER IL 2021

Perfezionare e promuovere la piattaforma sperimentale BE-ECM, in particolare approfondire la conoscenza biologica tramite l'uso di sistemi biofisici per esplorare l'attività cellulare, in particolare:

- Studiare la crescita cellulare e la formazione di tessuto in BECT microintegrate con cellule. Pubblicare lavori scientifici, come come ultimo autore, basati sulla ricerca condotta durante il dottorato di A. Adamo.
- Valutare curve di degradazione di nuovi prototipi di valvole atrioventricolari ingegnerizzate sviluppate nella linea di ricerca TEHV.
- Valutare effetti della topologia dell'intima ingegnerizzata (linea TEVG) sulla proliferazione e stabilità delle cellule endoteliali, proteggere relativa potenziale IP.
- Valutare l'espressione di proteine, l'espressione genica e il signaling meccanico delle cellule seminate a contatto con gli *scaffold*.
- Testare l'uso di superfici ibride con pattern fibrosi sull'attività cellulare.
- Presentazione di proposte di ricerca ERC e NFS.
- Presentazione di proposte di ricerca R01 e R21.

CONFERENZE

- Y. Kawakami, K. Nonaka, N. Fukase, A. D'Amore, J. Cummins, R. Kuroda, W. Wagner, J. Huard. A New Cell-free Biodegradable Synthetic Artificial Ligament for The Reconstruction Of Anterior Cruciate Ligament (ACL) In A Rat Model. Orthopedic Research Society (ORC) 2020 Annual Meeting, February 8-11, 2020 Phoenix, Arizona.

PUBBLICAZIONI

- N. Kashiya, R. Kormos, Y. Matsumura, A. D'Amore, S. Miyagawa, Y. Sawa, W. R. Wagner. An adipose derived stem cells sheet combined with an elastic synthetic patch incorporating cardiac ECM enhanced cell survival and preserved cardiac function in rats following subacute myocardial infarction. In press on J. of Thoracic and Cardiovascular Surgery, IF 4.46.
- Controlling in-plane mechanics of electrospun polyurethane scaffolds for cardiac tissue engineering applications. S. K. Luketich, G. Menallo, G. Nasello, M. Maneschi, F. Gulizzi, P. Livreri, W. R. Wagner, and A. D'Amore. To be submitted to Journal of Mechanical Behavior of Biomedical Materials, IF: 3.23
- A. Adamo, J. Bartolacci, M. Traina, W. Wagner, S.F. Badyak, A. D'Amore. Bio-processing, structure, mechanics and hevaluation of micro-fiber based biodegradable suture material. To be submitted to Biomaterials, 5Y-IF 8.97.
- A Cell-free Biodegradable Synthetic Artificial Ligament for the Reconstruction of Anterior Cruciate Ligament (ACL) in a Rat Model. Y. Kawakami, K. Nonaka, N. Fukase, A. D'Amore, Y. Murata, P. Quinn, S. Luketich, K. Takayama, T. Matsumoto, J. H. Cummins, M. Kurosaka, R. Kuroda, W. R. Wagner, F. H. Fu, J. Huard. on Acta Biomaterialia, 5Y-IF 7.16.

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

Antonio D'Amore, PhD
adamore@fondazionerimed.com

COLLABORAZIONI

- University of Pittsburgh, Pittsburgh, Stati Uniti
- University of Pittsburgh Medical Center, Pittsburgh, Stati Uniti
- Politecnico di Milano, Milano, Italia

AREA TERAPEUTICA

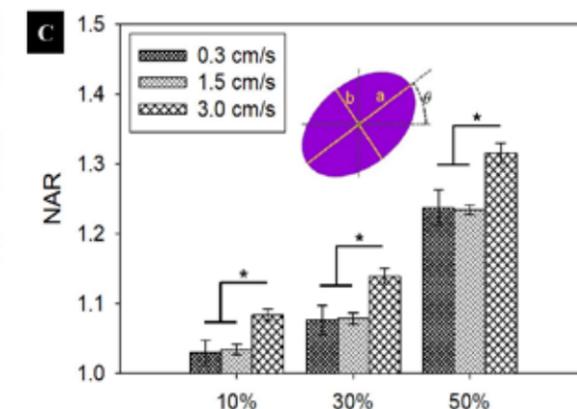
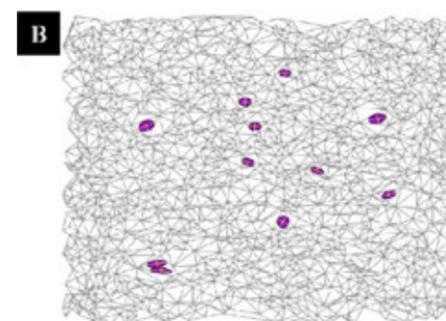
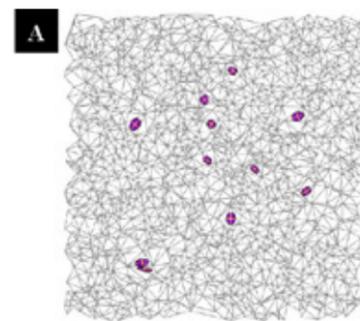
- Insufficienze d'organo
- Oncologia
- Patologie dell'invecchiamento

PIPELINE



BREVE DESCRIZIONE

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



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

IMPATTO

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

RISULTATI RAGGIUNTI NEL 2020

- Progetto BioMitral finanziato da ERC Consolidator Grant. L'attività numerica del progetto BioMitral prevede 1) la caratterizzazione meccanica di valvole mitrali ingegnerizzate senza stent tramite metodi ad elementi finiti (FEM); 2) l'identificazione del numero e della posizione ottimale delle corde tendinee.
- Modelli numerici precedentemente sviluppati, supportati da test sperimentali, sono stati utilizzati per analizzare differenze nel comportamento meccanico delle fibre muscolari tra pazienti giovani e anziani. I risultati di questo studio sono al momento in fase di pubblicazione.

OBIETTIVI PER IL 2021

- Gli obiettivi per il 2021 sono in linea con il ruolo ancillare che questa linea di ricerca svolge nell'ambito del programma di ingegneria di tessuto cardiovascolare della Fondazione Ri.MED e delle azioni congiunte con i suoi partner di ricerca clinica, in particolare:
- supporto alla progettazione per linee di ricerca TEHV, TECP e TEVG;
 - supporto alla modellazione *in vitro* prevista in BE-ECM;
 - sviluppo modelli predittivi di crescita tissutale sulla base degli studi *in vivo* completati:
 - D'Amore, T. Yoshizumi, S. K. Luketich, M. T. Wolf, X. Gu, M. Cammarata, R. Hoff, S.F. Badylak, and W. R. Wagner. Bi-layered polyurethane-extracellular matrix cardiac patch improves ischemic ventricular wall remodeling in a rat model. *Biomaterials* 2016 (107), 1-14, 5Y-IF 8.97;
 - D'Amore, M. Fazzari, H. Jiang, S. K. Luketich, M. E. Luketich, R. F. Hoff, D. L. Jacobs, X. Gu, S. F. Badylak, B. A. Freeman, W.R. Wagner. Nitro-oleic acid (NO₂-OA) release enhances regional angiogenesis in a rat abdominal wall defect model. *Tissue Engineering Part A* 2018, IF 3.58;
 - sviluppo modelli di simulazione degradazione di scaffold *in vivo*;
 - sviluppo modelli di simulazione di migrazione cellulare al variare della topologia del biomateriale.

PUBBLICAZIONI

- G. Coyan, L. Silveira Filho, Y. Matsumura, S. Luketich, W. Katz, V. Badhwar, W. Wagner, A. D'Amore. Acute *in vivo* functional assessment of a stentless elastomeric biodegradable tricuspid valve. *Journal of Cardiovascular Translational Research*, DOI: 10.1007/s12265-020-09960-z, IF 2.75.

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

Antonio D'Amore, PhD
adamore@fondazionerimed.com

COLLABORAZIONI

- University of Pittsburgh, PA
- Università degli Studi di Palermo, Italia

AREA TERAPEUTICA

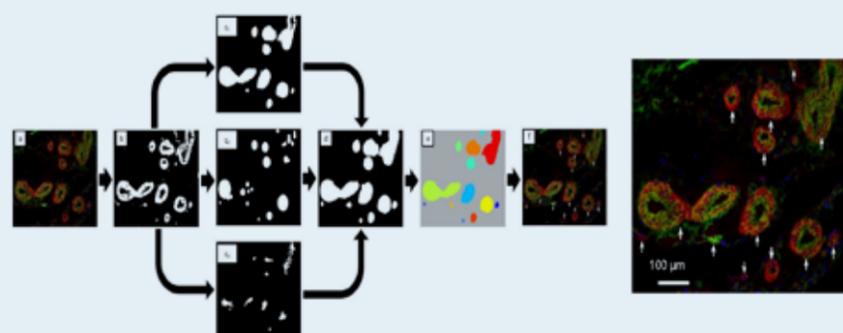
- Insufficienze d'organo
- Patologie dell'invecchiamento
- Oncologia

PIPELINE



BREVE DESCRIZIONE

Tema: NET-IBA, sviluppo di algoritmi e metodi automatici per l'analisi strutturale e morfologica di tessuti nativi e scaffolds. L'istopatologia ed i metodi di analisi quantitativa di struttura su base immagine sono al momento scarsamente sviluppati in modo integrato. Gran parte delle valutazioni in istologia avvengono ancora sulla base di stime qualitative o semi-qualitative. Analogamente, i metodi di analisi strutturale sulla base di immagine, sviluppati in contesti di scienza dei materiali, trascurano svariate metriche quantitative per micro e meso architettura. Questa linea di ricerca si posiziona all'interfaccia tra queste due discipline nel tentativo di fornire nuovi strumenti di indagine sia in ambito clinico che in ambito scienza dei materiali.



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

IMPATTO

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

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

RISULTATI RAGGIUNTI NEL 2020

- Fornita attività di supporto per laboratori del McGowan Institute per metodi di analisi topologica di ECM di tessuti nativi e scaffold, questo include due NIH-R01s attualmente in svolgimento in collaborazione con Dr Ambrosio;
- Verifica e validazione del software sviluppato in collaborazione con il Dr Bruno in grado di elaborare dati da microscopia per fluorescenza;
- Completata l'implementazione di un codice automatico per la segmentazione morfologica dei vasi sanguigni individuati e classificati per categorie secondo quanto dimostrato sperimentalmente in : "A. D'Amore, M. Fazzari, H. Jiang, S. K. Lukeitch, M. E. Luketich, R. F. Hoff, D. L. Jacobs, X. Gu, S. F. Badylak, B. A. Freeman, W.R. Wagner. Nitro-oleic acid (NO2-OA) release enhances regional angiogenesis in a rat abdominal wall defect model. Published on Tissue Engineering Part A."

Fondi di ricerca ottenuti e/o gestiti

- European Research Council (ERC) "Consolidator Award 2020": "BIOMITRAL", \$ 2 milion for 5 years. Sole Principal-Investigatior: A.D'Amore, Fondazione Ri.MED, Italia, (2020-2025).
- Frazione di start-up package as Head of the Cardiac Tissue Engineering Program, \$ 1.75 million for 3 years. Sole Principal-Investigatior: A. D'Amore, Fondazione Ri.MED, Italy (2020-2023);

Attività di docenza

- Guest lecturer for the biomedical engineering master of science and PhD program, BIOENG 2810 - Biomaterials & biocompatibility. Department of bioengineering, University of Pittsburgh. Title: "A brief overview on polymers processing methods for soft tissue engineering", 2016-2020;
- Guest lecturer for the biomedical engineering master of science and PhD program, MSCMP 3735 - Extracellular matrix in tissue biology and bioengineering. Department of bioengineering, University of Pittsburgh. Title: "Cardiac ECM: structure - function, damage mechanism, and tissue engineering approaches to facilitate constructive remodeling", 2015-2020.

Attività di tutoraggio

- Dr A. Adamo, Fondazione Ri.MED, esperto in meccano biologia;
- Dr F. Cosentino 2020, Fondazione Ri.MED, esperto in metodi numerici;

Lezioni su invito

- "Advancing Bioinspired polymer processing: how improved control over biomaterial structure-function can facilitate translation", school of engineering Polytechnic University of Turin, Turin, December 17th 2020;
- "Advancing electrodeposition technologies to enhance control of polymeric heart valve structure and function", Pathway to Market for TEMP Companies Workshop - a BioFab and Mayo Clinic Collaboration, Cleveland, December 7th 2020;
- "Ri.MED cardiac tissue engineering program, an overview to foster joint proposal applications", Monzino Cardiology Center, Milan, December 1st 2020;
- "Does bioinspired control of structure - function matter for tissue engineering heart valves? ", Division of pediatric cardiothoracic surgery, Children Hospital, University of Pittsburgh, Pittsburgh, March 6-2020.

OBIETTIVI PER IL 2021

- 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 prevede l'estensione di questo metodo su 3D e sulla base di dati da microscopia confocale;
- Valutazione preliminare per creazione di una seconda Ri.MED-Pitts start-up per la linea di ricerca NET-IBA.

CONFERENZE

- Kawakami, K. Nonaka, N. Fukase, A. D'Amore, J. Cummins, R. Kuroda, W. Wagner, J. Huard. A New Cell-free Biodegradable Synthetic Artificial Ligament For The Reconstruction Of Anterior Cruciate Ligament (ACL) In A Rat Model. Orthopedic Research Society (ORC) 2020 Annual Meeting. February 8-11, 2020 Phoenix, Arizona.

PUBBLICAZIONI

- A. Adamo, J. Bartolacci, M. Traina, W. Wagner, S.F. Badylak, A. D'Amore. Bioprocessing, structure, mechanics and hevaluation of micro-fiber based biodegradable suture material. To be submitted to Biomaterials, 5Y-IF 8.97.
- A. Adamo, A. Bruno, G. Menallo, M.G. Francipane, M. Fazzari, E. Ardizzone, W. Wagner, A. D'Amore. An automatic blood vessel detection algorithm for tissue engineering applications and quantitative histology. To be submitted to Annals of Biomedical Engineering, IF.3.47.

Parete di miocardio ingegnerizzata (TECP)

Antonio D'Amore, PhD
adamore@fondazionerimed.com



COLLABORAZIONI

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



AREA TERAPEUTICA

Insufficienze d'organo



IMPATTO

L'obiettivo di questa linea di ricerca è l'introduzione di strategie e tecnologie innovative per mitigare il rimodellamento maladattativo indotto dall'infarto del miocardio.

Congestive heart failure (CHF) rimane una condizione di notevole impatto epidemiologico (2.1% della popolazione in US) ancora parzialmente trattata con successo da terapie farmacologiche, chirurgiche o dai VAD.

I dispositivi di confinamento cardiaco biodegradabili si propongono come una potenziale terapia ponte in attesa del trapianto d'organo o come una strategia sinergica rispetto l'impiego di un VAD. Ulteriore potenziale campo di applicazione riguarda il *patching* del ventricolo destro finalizzato alla riduzione degli effetti legati alla ipertensione polmonare.



RISULTATI RAGGIUNTI NEL 2020

Completato studio *in vivo* su ratto, valutati effetti della sequenza temporale d'intervento per il *patch* cardiaco a doppio strato, risultati principali: riduzione assottigliamento parete, angiogenesi, riduzione tessuto fibrotico, mantenimento funzione ventricolare a 10 settimane dall'infarto, diminuzione dell'infiammazione, switch macrofagico al fenotipo M2.

Fondi di ricerca ottenuti e/o gestiti

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

Attività di docenza

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

- Guest lecturer for the biomedical engineering master of science and PhD program, MSCMP 3735 – Extracellular matrix in tissue biology and bioengineering. Department of bioengineering, University of Pittsburgh. Title: "Cardiac ECM: structure - function, damage mechanism, and tissue engineering approaches to facilitate constructive remodelling".

Attività di tutoraggio

- A. Adamo, PhD candidate, University of Palermo Italy, sviluppo del *patch* cardiaco e caratterizzazione biochimica.

Lezioni su invito

- "Ri.MED cardiac tissue engineering program, an overview to foster joint proposal applications", Monzino Cardiology Center, Milan, December 1st 2020

- "Advancing Bioinspired polymer processing: how improved control over biomaterial structure-function can facilitate translation", school of engineering Polytechnic University of Turin, Turin, December 17th 2020;

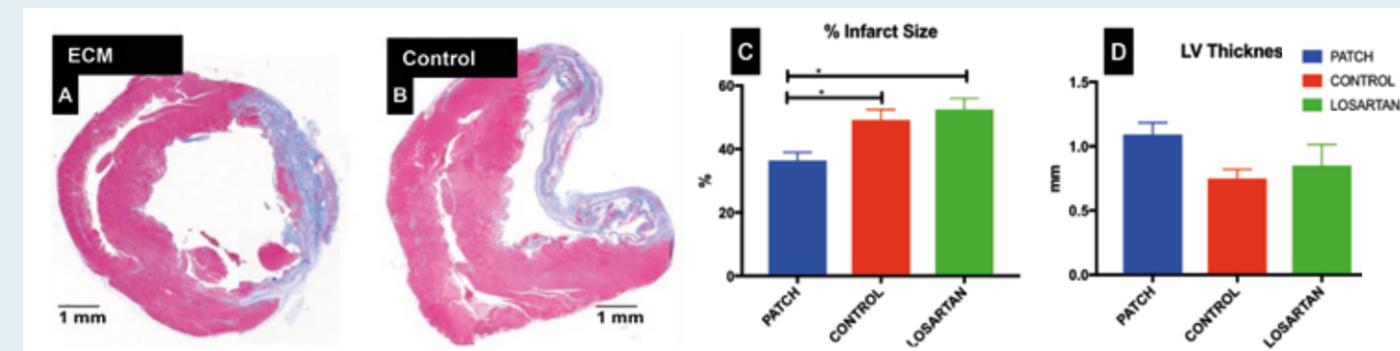
PIPELINE



BREVE DESCRIZIONE

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

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



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

OBIETTIVI PER IL 2021

L'obiettivo di lungo termine rimane la traslazione della tecnologia che viene inquadrata come un dispositivo di classe III FDA, gli obiettivi specifici per l'anno 2021 sono:

- Valutazione di *scaffold* per *patch* cardiaco su modello animale di larga taglia, obiettivi primari: (I) mantenimento delle funzioni ventricolari; (II) crescita tessutale endogena/riduzione di tessuto fibrotico; (III) riduzione dell'assottigliamento della parete di miocardio;
- Presentazione proposte di ricerca al Ministero della Salute Italiano, in collaborazione con Centro Cardiologico Monzino ed ISMETT;
- Presentazione proposte di ricerca NIH R01 ed R21;
- Studio preclinico su infarto cronico del miocardio su modello ovino;
- Esplorare tecniche di impianto minimamente invasivo del *patch* cardiaco, progetto in collaborazione con il Dr Pilato, Dr Morsolini, Dr Raffa (ISMETT) e Drs Coyan, Silveira Filho (UPMC and Univ. of Campinas Brazil);
- Sviluppo di una piattaforma robotica per processing avanzato, protetta da proprietà intellettuale, in collaborazione con Advance Solution
- Saggiare gli effetti, i metodi e il potenziale terapeutico del *patching* di ventricolo destro, progetto in collaborazione con il Dr Coyan, Dr Silveira-Filho e Dr Sciortino.

PUBBLICAZIONI

- N. Kashiyama, R. Kormos, Y. Matsumura, **A. D'Amore**, S. Miyagawa, Y. Sawa, W. R. Wagner. An adipose derived stem cells sheet combined with an elastic synthetic patch incorporating cardiac ECM enhanced cell survival and preserved cardiac function in rats following subacute myocardial infarction. J. of Thoracic and Cardiovascular Surgery, IF 4.46.
- Lindemberg M. Silveira-Filho, Garrett N. Coyan, Arianna Adamo, Samuel K. Luketich, Giorgio Menallo, **Antonio D'Amore** and William R. Wagner. "Can a biohybrid patch salvage ventricular function at late time point in post-infarction remodeling process?" In press on Journal of American College of Cardiology, Basic to Translational Research. IF 2.43

PROPRIETÀ INTELLETTUALE

- US patent application PCT/US20/42115, filed on 07/2020, topic: biomedical device, title: "Processing method and apparatus for micro-structured rope-like material". Lead innovator/developer: **A D'Amore**.

PRODOTTI: DISPOSITIVI BIOMEDICALI E ORGANI ARTIFICIALI

Valvole cardiache ingegnerizzate (TEHV)

Antonio D'Amore, PhD
adamore@fondazioneirimed.com

COLLABORAZIONI

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

AREA TERAPEUTICA

Insufficienze d'organo

PIPELINE



BREVE DESCRIZIONE

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

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

- Sviluppo di tecnologie e strategie di intervento percutaneo transcateretere.

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

IMPATTO

Circa 80.000 pazienti all'anno richiedono una sostituzione valvolare in USA. La pratica clinica oggi prevede l'impiego di due classi di protesi: le valvole meccaniche e le bioprotesi. Le prime, per quanto longeve, richiedono l'uso di terapia anticoagulante cronica che a sua volta è associata con diversi fattori di rischio in aggiunta ad una riduzione della qualità della vita del paziente.

La seconda categoria non richiede terapia anticoagulante cronica ma è soggetta ad una serie di fenomeni deteriorativi tra i quali la degenerazione calcifica. Le tecnologie sviluppate dal gruppo hanno l'obiettivo di superare i limiti di queste due classi di dispositivi biomedicali offrendo ai pazienti delle valvole cardiache che crescono con il paziente, non richiedono terapia anticoagulante e non sono esposte alla degenerazione calcifica. Tale ricerca è inoltre funzionale allo sviluppo di tecnologie innovative di lavorazione dei polimeri applicabili in altri contesti, nonché alla creazione di dispositivi biomedicali ibridi basati su metallo biodegradabile-polimero biodegradabile.

RISULTATI RAGGIUNTI NEL 2020

Formata la prima Pitt-Ri.MED start-up: "Neoolife". Concessi quattro brevetti in licenza. Proseguita la valutazione del prototipo di valvola mitrale con apparato cordale incluso. Proseguiti test *in vivo* su *Large Animal Model* per la valutazione dei progressi su valvola mitrale. Proseguito studio della mecano-biologia delle *corde tendinee*. Proseguito studio sul trasferimento di un micro-pattern

sulla superficie di un tessuto elettrofilato. Consolidata ed estesa IP per la fabbricazione di *scaffold* con micro-topologia integrata capace di influenzare l'attività cellulare. Avviata un'unità di ricerca in Ingegneria Tissutale Ri.MED a Palermo (ITA) in collaborazione con ATeN Center e UniPA. Avviate collaborazioni internazionali Italia/USA.

Fondi di ricerca ottenuti e/o gestiti

- (2020-2025) European Research Council (ERC) "Consolidator Award 2020": "BIOMITRAL", \$ 2 million for 5 years. Sole Principal-Investigator: A. D'Amore, Fondazione Ri.MED, Italy;
- Pitt Innovation Challenge (PiInCh) program. OneValve: The Self Generating Heart Valve, the team (Drs Coyan, D'Amore, Wagner) was ranked #1st and was awarded for \$ 100,000. PI: A. D'Amore, Univ. of Pittsburgh;
- Randall family big idea competition, University of Pittsburgh. Team: A. Adamo, G. Coyan, D Pedersen. Second place presentation winner - \$15000, principal investigator: A. D'Amore.

Attività di docenza

- Mentor for the Institute for Clinical Research Education (ICRE). Career development program training the next generation of clinical and translational scientists, Univ. of Pittsburgh. Trainee: Casey, Tompkins-Rhoades 2019-2021;
- Guest lecturer for the biomedical engineering master of science and PhD program, BIOENG 2810 - Biomaterials & biocompatibility. Department of bioengineering, University of Pittsburgh. Title: "A brief overview on polymers processing methods for soft tissue engineering";
- Guest lecturer for the biomedical engineering master of science and PhD program, MSCMP 3735 - Extracellular matrix in tissue biology and bioengineering. Department of bioengineering, University of Pittsburgh. Title: "Cardiac ECM: structure - function, damage mechanism, and tissue engineering approaches to facilitate constructive remodeling".

Attività di tutoraggio

- A. Adamo, PhD candidate, University of Palermo Italy, engineering chordae tendineae, bioprocessing and cell seeding;
- P. Terranova, University of Palermo Italy, topological cues for enhanced endothelial cell proliferation, bioprocessing;
- C. T. Rhoades, School of Medicine, University of Pittsburgh USA, engineered mitral valve optimization via FEM.

Interventi su invito

- A. D'Amore. "Advancing Bioinspired polymer processing: how improved control over biomaterial structure-function can facilitate translation", school of engineering Polytechnic University of Turin, Turin, December 17th 2020;
- A. D'Amore. "Advancing electrodeposition technologies to enhance control of polymeric heart valve structure and function", Pathway to Market for TEMP Companies Workshop - a BioFab and Mayo Clinic Collaboration, Cleveland, December 7th 2020;
- A. D'Amore. "Ri.MED cardiac tissue engineering program, an overview to foster joint proposal applications", Monzino Cardiology Center, Milan, December 1st 2020;
- A. D'Amore. "Does bioinspired control of structure - function matter for tissue engineering heart valves?", Division of pediatric cardiothoracic surgery, Children Hospital, University of Pittsburgh, Pittsburgh, March 6-2020.

OBIETTIVI PER IL 2021

L'obiettivo di lungo termine e' la traslazione della tecnologia (class III FDA), obiettivi specifici per il 2021 sono definiti come segue:

- Esecuzione studio finanziato da Pittsburgh Innovation Challenge Award su polmonare stented DCD + magnesio degradabile;

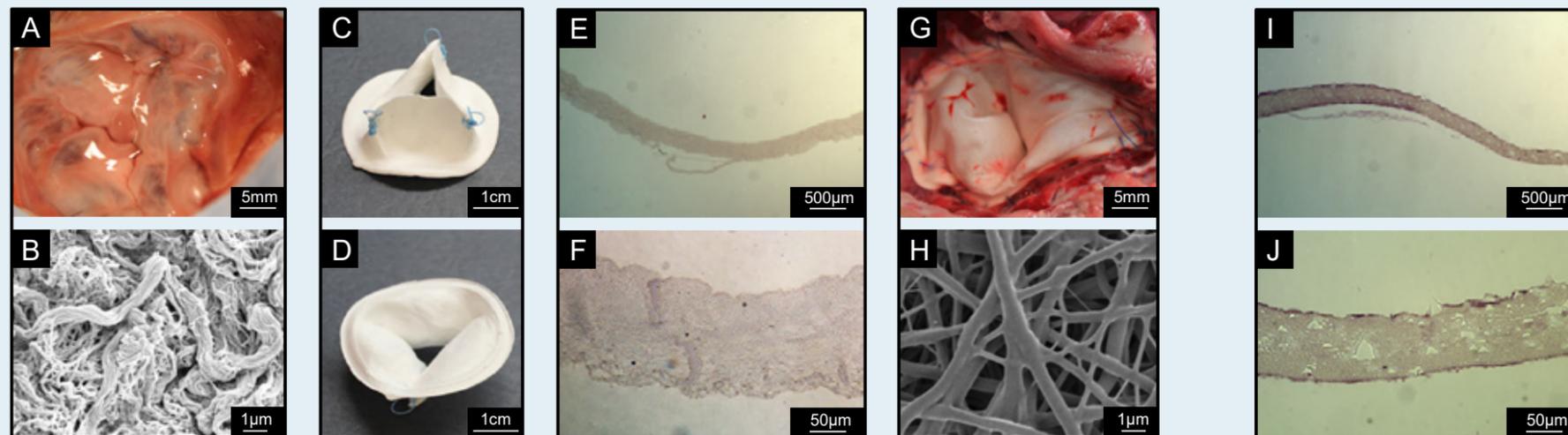
- Realizzazione di una pipeline per sintesi polimeri, estrazione ECM, elaborazione *scaffold*, istologia, immunofluorescenza, biomeccanica e microscopia avanzata;
- Formulazione proposta progettuale per finanziare studio cronico su protesi mitrale DCD: NIH R01;
- Pubblicazione review su modelli di bioprocessing per TEHV;
- Competizione per finali alla Betty Moore Foundation Innovators award;
- Modellazione FEM apparato cordale;
- Valutazione nuove strategie di deposizione selettiva di fibre per DCD;
- Inizio studio acuto per valvola mitrale con *corde tendinee*.
- Protezione e consolidamento IP;
- Ulteriore sviluppo di di Neoolife e completamento dei progetti finanziati sulla linea TEHV.
- Formazione personale: quattro studenti di laurea master, tre dottorandi;
- Consolidamento programma di internship McGowan Institute-UNIPA.

CONFERENZE

- Y. Kawakami, K. Nonaka, N. Fukase, A. D'Amore, J. Cummins, R. Kuroda, W. Wagner, J. Huard. A New Cell-free Biodegradable Synthetic Artificial Ligament for The Reconstruction Of Anterior Cruciate Ligament (ACL) In A Rat Model. Orthopedic Research Society (ORC) 2020 Annual Meeting. February 8-11, 2020 Phoenix, Arizona.

PUBBLICAZIONI

- Elastomeric tissue engineered template based tricuspid valve. Y. Matsumura, L. M. Silveira-Filho, G. Coyan, A. D'Amore, W. R. Wagner. To be submitted to J. of Thoracic and Cardiovascular Surgery, IF 4.88.
- Controlling in-plane mechanics of electrospun polyurethane scaffolds for cardiac tissue engineering applications. S. K. Luketich, G. Menallo, G. Nasello, M. Maneschi, F. Gulizzi, P. Livreri, W. R. Wagner, and A D'Amore. To be submitted to Journal of Mechanical Behavior of Biomedical Materials, IF: 3.23.
- Z. Machaidze*, A. S. Bayoumi*, A. D'Amore, K. Feaver, W. Zang, B. Rego, D. Cooper, S. Shimada, K. Rich, J. Wen, D.W. Brown, R. Padera, F. J. Schoen, E. Aikawa, W. R. Wagner, M. S. Sacks and J. E. Mayer. Tissue formation and remodeling of acellular elastomeric scaffold in ovine single pulmonary leaflet replacement model. Submitted to Tissue Engineering, IF 3.5. *equal contribution.
- Can a biohybrid acellular patch salvage ventricular function at late time point post-infarction remodeling process? L. M. Silveira-Filho, G. Coyan, A. Adamo, S. K. Luketich, G. Menallo, A. D'Amore, W. R. Wagner. In press on Journal of American College of Cardiology Basic Trans. Science, IF 3.7.
- P. Mela, A. D'Amore. In situ heart valve tissue engineering: Is



TEHV: Acute *In Vivo* Functional Assessment of a Biodegradable Stentless Elastomeric Tricuspid Valve. A) Organ level view of porcine native valve. B) Fiber level view of the native tricuspid valve via scanning electron microscopy. Appearance of ventricular (C) and atrial (D) surface of an elastomeric, biodegradable, stentless tricuspid valve processed with double-component deposition (DCD) electrospinning prepared for the implantation. Hematoxylin and eosin (H&E) staining of poly(carbonate urethane)urea leaflet cross sections prior to implant under low-(E) and high (F)-power magnification demonstrated porous and non-delaminated leaflet architecture. G) In situ view of engineered stentless tricuspid valve. Note how the shape of the engineered valve mimics the configuration observed in the native valve structure in (A). H) Fiber scale structure of the engineered valve via scanning electron microscopy showing comparable fiber intersection density, fiber diameter, and pore size to those observed in (B). After 24 h of implantation, H&E demonstrated that leaflets retained their initial structure with a proteinaceous deposit detected on lower power magnification (I), and no evidence of thrombi and cellular infiltration on higher power examination (J).

- scaffold structural biomimicry overrated? In press on Journal of American College of Cardiology Basic Trans. Science, IF 3.7.
- G. Cohan, L. Silveira Filho, Y. Matsumura, S. Luketich, W. Katz, V. Badhwar, W. Wagner, **A. D'Amore**. Acute in vivo functional assessment of a stentless elastomeric biodegradable tricuspid valve. In press on J. of Cardiovascular Translational Research, DOI: 10.1007/s12265-020-09960-z, IF 2.75.
 - Y. Matsumura, Y. Zhu, H. Jiang, **A. D'Amore**, S. K. Luketich, V. Charwat, T. Yoshizumi, H. Sato, B. Yang, T. Uchibori, K. E. Healy, W. R. Wagner. Intramyocardial injection of a fully synthetic hydrogel attenuates left ventricular remodeling post myocardial infarction. Biomaterials 2019, 217, 119289, 5Y-IF 8.97.
 - Y. Kawakami, K. Nonaka, N. Fukase, **A. D'Amore**, J. Cummins, R. Kuroda, W. Wagner, J. Huard. A Cell-free Biodegradable Synthetic Artificial Ligament For The Reconstruction Of Anterior Cruciate Ligament (ACL) In A Rat Model. Orthopedic Research Society (ORC) 2020 Annual Meeting, February 8-11, 2020 Phoenix, Arizona.



Patent issued

- US patent application PCT/US2016/019849 with WO (International publication number WO 2016/138423) published on 09/2016, topic: biomedical device, title: "Retrievable self-expanding non-thrombogenic low-profile percutaneous atrioventricular valve prosthesis". Nationalization phase in USA and EU. US Patent issued in 06-04-2020.

New patent applications

- US provisional patent application. Pitt invention disclosure ID#05453 filed on 07/2020, topic: bioprocessing methods, title: "Hybrid micro molding-fiber deposition substrate processing for cell biology manipulation and local anisotropy". Lead innovator/developer: **A D'Amore**.
- US provisional patent application. Pitt invention disclosure ID#05360 filed on 05/2020, topic: biomedical device/controlled release system, title: "Shape memory, polymeric, degradable drug eluting platform for nitro-fatty acid release". Lead innovator/developer: **A D'Amore**.

Licensed patents and patent applications

- US patent application PCT/US2019/029121 with WO (International publication number WO/2019/210059) published in 11/2019, topic: biomedical device, title: "Biodegradable metallic stent for heart valve tissue engineering". Lead innovator/developer: **A D'Amore**. Licensed to Neolife Inc. in 10-2020.
- US patent application PCT/US2018/019358 with WO (International publication number WO/2018/156856) published in 08/2018,

- topic: biomedical device, title: "A stentless biopolymer heart valve replacement capable of living tissue regeneration". Lead innovator/developer: **A D'Amore**. Nationalization phase in USA and EU. Licensed to Neolife Inc. in 10-2020.
- US patent application PCT/US2016/019837 with WO (International publication number WO 2016/138416) published in 09/2016, topic: biomedical device, title: "Double component mandrel for electrospun stentless multi-leaflet valve fabrication". Lead innovator/developer: **A D'Amore**. Nationalization phase in USA, EU, Canada and Japan. Licensed to Neolife Inc. in 10-2020.
- US patent application PCT/US2016/019849 with WO (International publication number WO 2016/138423) published on 09/2016, topic: biomedical device, title: "Retrievable self-expanding non-thrombogenic low-profile percutaneous atrioventricular valve prosthesis". Nationalization phase in USA and EU.
- US Patent issued in 06-04-2020, publication number: US-2020-0170791-A1. Licensed to Neolife Inc. in 10-2020.

PRODOTTI: DISPOSITIVI BIOMEDICALI E ORGANI ARTIFICIALI



Vasi sanguigni ingegnerizzati (TEVG)

Antonio D'Amore, PhD
adamore@fondazioneirimed.com



COLLABORAZIONI

- Ospedale Cervello - Villa Sofia, Palermo, Italia
- University of Pittsburgh Medical Center, Pittsburgh, USA
- University of Pittsburgh, USA
- ATeN Center, Università degli Studi di Palermo, Italia
- LivaNova PLC, Londra, Regno Unito



AREA TERAPEUTICA

Insufficienze d'organo

PIPELINE



BREVE DESCRIZIONE

Tema: TEVG, sviluppo di vasi sanguigni ingegnerizzati da impiegare come protesi vascolari nel bypass coronarico.

Le soluzioni attualmente disponibili per la sostituzione di un vaso stenotico includono l'autotrapianto, ad esempio una porzione della vena safena, o l'impiego di materiali artificiali come Dacron e Teflon. La prima tipologia d'intervento è chiaramente limitata dalla bio-disponibilità di tessuto autologo. La seconda, utilizza materiali sintetici che inducono una ri-stenosi del vaso fino ad un 50% dei casi trattati. Queste problematiche possono essere potenzialmente risolte mediante l'approccio dell'ingegneria di tessuto.

Quest'ultimo propone di sostituire il vaso compromesso con uno scaffold in grado di indurre la crescita tissutale *in situ* e quindi di generare tessuto autologo, funzionale e non trombotogenico.

In questa linea di ricerca il nostro gruppo applica l'approccio dell'ingegneria di tessuto con due obiettivi principali:

- 1) progettare scaffold in grado di riprodurre la struttura e la meccanica del tessuto nativo;
- 2) ridurre l'iperplasia dell'intima mediante l'impiego di specifiche morfologie di superficie e di struttura dello scaffold.

IMPATTO

L'obiettivo principale di questa linea di ricerca è l'introduzione di strategie e tecnologie innovative per bypass coronarico e per il trattamento dell'ischemia degli arti inferiori. Alla luce dei limiti presentati dai vasi artificiali e dalle procedure chirurgiche attualmente utilizzate, introdurre e validare una tecnologia basata su vasi ingegnerizzati biodegradabili in grado di promuovere la crescita tissutale *in situ* ha un valore altamente innovativo e potenzialmente un elevato valore di mercato. Ulteriori esempi di altre applicazioni che possono beneficiare da progressi in questa tecnologia includono l'ingegnerizzazione dell'uretere o l'endotelizzazione delle cannule utilizzate da dispositivi di classe II e III.

RISULTATI RAGGIUNTI NEL 2020

Perfezionata tecnica di fabbricazione prototipo vaso artificiale a tre strati riprodotte la struttura della tunica intima, media ed adventitia, protetta IP ("Multi-Layered Graft for Tissue Engineering Applications", 2019). Testate differenti configurazioni di *scaffold* per avvalorare l'ipotesi di mitigare l'iperplasia della tunica intima. Introdotta tecnica di modifica di superficie di polimero alla micro e meso scala. Realizzazione di pattern per indurre la manipolazione delle cellule che aderiranno allo *scaffold* (Provisional Patent: "Hybrid micro molding-fiber deposition substrate processing for cell biology manipulation and local anisotropy"). Studi preliminari *in vitro*, eseguiti tramite bioreattore custom-made, per valutare la capacità delle cellule di infiltrarsi nel vaso artificiale a tre strati al fine di ottenere un costrutto funzionale *in situ*.

Fondi di ricerca

Frazione di start-up package as Head of the Cardiac Tissue Engineering Program, \$3 million for 3 years. Sole Principal-Investigator: A. D'Amore, Fondazione Ri.MED, Italia (2020-2023).

Premi conseguiti

Best poster presentation at The Annual Biomedical Research Conference for Minority Students (ABRCMS 2020). Title: "The Design, Fabrication, and Analysis of the In-vitro Efficacy of a Novel, Three-Layered, Small Diameter Vascular Graft". Author: M. Haghkar. Mentor: A. D'Amore, 2020.

Attività di docenza

- Guest lecturer for the biomedical engineering master of science and PhD program, BIOENG 2810 – Biomaterials & biocompatibility. Department of bioengineering, University of Pittsburgh. Title: "A brief overview on polymers processing methods for soft tissue engineering".
- Mentor for BIOENG 1095 - Special projects. Individual research project under the guidance of a faculty member. Department of bioengineering, University of Pittsburgh. Trainee: Mahdi Haghkar 2020.
- Mentor for ENGR1000 - Lab experiences. Individual research project under the guidance of a faculty member. Department of chemical and petroleum engineering, University of Pittsburgh. Trainee: Mahdi Haghkar 2020.

Attività di tutoraggio

- M. Barbuto, University of Palermo and University of Pittsburgh, development of three-layers small diameter vascular graft for reduced intima hyperplasia and enhanced endothelialization.
- M. A. Rodriguez Soto, 2020, Universidad de los Andes, Colombia, rational design and additive manufacture of regenerative vascular grafts: Understanding the interaction between blood cells-surface.
- M. Haghkar, University of Pittsburgh USA, topological cues for

enhanced endothelial cell proliferation and structural organization in engineered vascular graft.

- P. Terranova 2019-2020, University of Palermo Italy, bioprocessing of polymeric fibrous substrates at the meso scale for cell manipulation.
- G. C. Miceli 2019-2020, Milan Polytechnic Italy, biomimetic three-layers vascular graft, cell proliferation and de-novo collagen synthesis.

OBIETTIVI PER IL 2021

L'obiettivo a lungo termine è la traslazione della tecnologia (Classe III FDA), gli obiettivi specifici per il 2021 sono:

- Sviluppare vasi ingegnerizzati innovativi con i seguenti obiettivi principali:
 - riprodurre la meccanica fisiologica di arterie e vene;
 - indurre la crescita tessutale endogena riproducendo la funzionalità del vaso con una bassa trombogenicità;
 - ridurre l'iperplasia intima.
- Caratterizzare dal punto di vista biomeccanico delle coronarie umane, in collaborazione con la fondazione Core;
- Continuare gli studi preclinici su modello animale (ratto, chronic model) in collaborazione con l'Università di Pittsburgh;
- Riprodurre l'architettura e la struttura della membrana basale nativa per garantire un'adeguata endotelizzazione della tunica intima limitando la cascata della coagulazione e la formazione di trombi (che sono enormi limiti nell'applicazione clinica del TEVG);
- Ottimizzare l'ottenimento dei pattern e studiare come questi possono influenzare l'adesione e la proliferazione cellulare;
- Stabilire una collaborazione con LIVANOVA per supportare l'idea di endotelizzare il vaso ingegnerizzato per mitigare l'iperplasia dell'intima;
- Verificare *in vivo*, su modello animale, il potenziale della IP sviluppata ("Multi-Layered Graft for Tissue Engineering Applications", 2019).

CONFERENZE

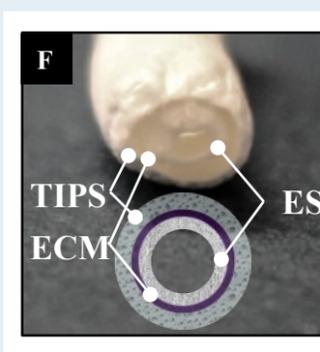
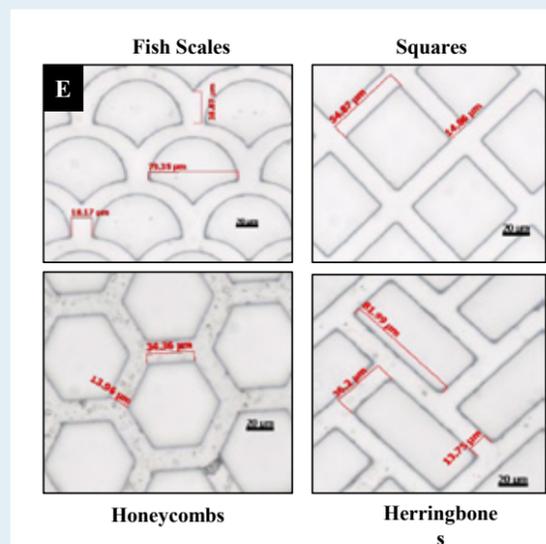
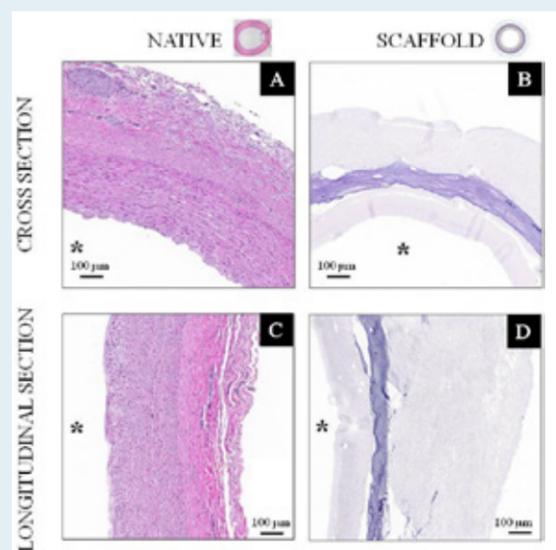
- "Advancing Bioinspired polymer processing: how improved control over biomaterial structure-function can facilitate translation", Dicembre, 2020, Scuola di Ingegneria, Politecnico di Torino, Torino, Italia. Speaker: **A. D'Amore**.
- "Ri.MED cardiac tissue engineering program, an overview to foster joint proposal applications", Dicembre, 2020, Centro Cardiologico Monzino, Milano, Italia. Speaker: **A.D'Amore**.

PUBBLICAZIONI

- T. K. Valencia-Rivero, J. Cruz, A. Castillo-Martínez, L. Lina, **A. D'Amore**, W. Wagner, J. C. Briceño. "SIS-Based regenerative vascular grafts: PEGylation and carboxylic acid conjugation to improve key attributes". Submitted to Journal of Materials Science and Engineering: C, IF 3.42.
- E. M. Cunnane, K. L. Lorentz, L. Soletti, A. K. Ramaswamy, T. K. Chung, D. G. Haskett, S. K. Luketich, E. T. Tzeng, **A. D'Amore**, W. R. Wagner, J. S. Weinbaum, D. A. Vorp., "Development of a semi-automated, bulk seeding device for large animal model implantation of tissue engineered vascular grafts", *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*, 8, 2020, doi.org/10.3389/fbioe.2020.597847.

PROPRIETÀ INTELLETTUALE

- US provisional patent application. Pitt invention disclosure ID#05453 filed on 07/2020, topic: bioprocessing methods, title: "Hybrid micro molding-fiber deposition substrate processing for cell biology manipulation and local anisotropy". Lead innovator/developer: **A. D'Amore**.
- US patent application PCT/US20/42115, filed on 07/2020, topic: biomedical device, title: "Processing method and apparatus for micro-structured rope-like material". Lead innovator/developer: **A D'Amore**.
- US patent application PCT/US2018/043889, with WO (International publication number WO/2019/023447) published in 08/2019, topic: biomedical device, title: "Multi-Layered Graft for Tissue Engineering Applications". Lead innovator/developer: **A D'Amore**.
- US patent application PCT/US2018/061862 with WO (International publication number WO/2019/100021) published in 05/2019, topic: controlled release system/drug for angiogenesis, title: "Nitro-oleic acid (NO₂-OA) controlled release platform to induce regional angiogenesis in abdominal wall repair". Lead innovator/developer: **A D'Amore**.



TEVG: Three-layer vascular graft duplicating coronary arteries' structure and mechanics. (A-D) Native and engineered vessel cross section and longitudinal section comparison showing a three layer arrangement mimicking the tunica intima, media and adventitia. Asterisk indicates the vessel's lumen. (E) Patterned PDMS transferred via electrodeposition on scaffold for enhanced cell adhesion and proliferation. (F) Macro scale view of the scaffold cross section showing the engineered tunica intima processed by electrospinning (ES), the engineered tunica media made of cardiac derived extracellular matrix (ECM) gel and the engineered tunica adventitia processed by thermally induced phase separation (TIPS).

R-CaRe – Riabilitazione per la rigenerazione della cartilagine

Riccardo Gottardi, PhD
rgottardi@fondazionerimed.com

COLLABORAZIONI

- Bioengineering and Biomaterials Laboratory, Children's Hospital of Philadelphia (CHOP), Philadelphia, USA
- Dept. of Pediatrics, Perelman School of Medicine, University of Pennsylvania (UPenn), Philadelphia, USA
- Dept. of Bioengineering, School of Engineering and Applied Sciences, University of Pennsylvania (UPenn), Philadelphia, USA
- Center for Cellular and Molecular Engineering, Dept. of Orthopaedic Surgery, University of Pittsburgh, Pittsburgh, USA

AREA TERAPEUTICA

Patologie dell'invecchiamento

PIPELINE



BREVE DESCRIZIONE

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

riabilitazione ottimale. Poiché le forze meccaniche influenzano significativamente il comportamento cellulare (meccanobiologia), anticipare il momento in cui l'articolazione viene sottoposta a carico potrebbe migliorare la guarigione dei tessuti, accelerare la deposizione di matrice extracellulare e promuovere un fenotipo più ialino anziché fibrocartilagineo del tessuto rigenerato, come peraltro suggerito dai risultati di studi su animali e *in vitro*. Ci aspettiamo che il carico meccanico durante la riabilitazione possa essere sfruttato per dirigere la formazione del tessuto rigenerato. Con questo progetto, miriamo a migliorare i risultati della riparazione della cartilagine identificando i regimi di carico che possono essere applicati durante la riabilitazione per promuovere la rigenerazione della cartilagine, migliorare la riparazione dei tessuti e prolungarne la longevità.

IMPATTO

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

RISULTATI RAGGIUNTI NEL 2020

Nel contesto del progetto Regenerative-Cartilage Rehabilitation (R-CaRe) abbiamo progettato e realizzato un dispositivo automatizzato (High Throughput Mechanical Activator for Cartilage Engineering - HiT-MACE) in grado di applicare stress meccanici su un numero elevato di tessuti (nativi o ingegnerizzati) contemporaneamente ed in condizioni di sterilità. HiT-MACE è progettato per quantificare in maniera molto precisa la quantità di carico applicata, mantenendo tale valore costante nel tempo e riducendo, così, la variabilità sperimentale. Nel contesto del progetto abbiamo condotto dei test meccanici di durata ed entità definita su tessuti cartilaginei appli-

cando stress che mimano quelli fisiologici e supra-fisiologici, ed abbiamo quindi studiato la risposta della cartilagine a tali regimi. Siamo così riusciti a determinare le condizioni ottimali di regime di carico in grado di attivare importanti *pathways* intracellulari (TGF- β , SMAD 2/3) che inducono i processi anabolici che promuovono la rigenerazione cartilaginea. Tale approccio sperimentale ha consentito di determinare valori di carico ottimali che possono essere impiegati nella riabilitazione clinica al fine di massimizzarne i risultati.

OBIETTIVI PER IL 2021

I risultati ottenuti nel 2020 sono stati impiegati per sviluppare un modello avanzato di validazione preclinica che replica fedelmente la risposta della cartilagine *in vivo*. Tuttavia, è bene notare che la cartilagine è spazialmente e metabolicamente interconnessa con lo strato osseo sottostante nelle articolazioni. Gli obiettivi per il 2021 nel contesto del progetto R-CaRe mirano a migliorare ulteriormente il nostro modello sperimentale sviluppando una piattaforma pre-clinica più avanzata che includa il contributo dell'osso subcondrale alla risposta alla stimolazione meccanica. A tal fine, effettueremo ulteriori studi utilizzando unità osteocondrali (OC) native che riproducono fedelmente il microambiente articolare. I risultati attesi forniranno informazioni ancora più dettagliate sulla durata e sull'intensità dei cicli di carico da applicare per massimizzare gli effetti della terapia riabilitativa.

PUBBLICAZIONI

- Capuana, E., Marino D., Di Gesù R., La Carrubba, V., Brucato, V., Tuan, R.S., Gottardi, R. (2020). A High-Throughput Mechanical Activator for Cartilage Engineering Enables Rapid Screening of *in vitro* Response of Tissue Models to Physiological and Supraphysiological Loads. *Cells, Tissue, Organs*. (Accepted)

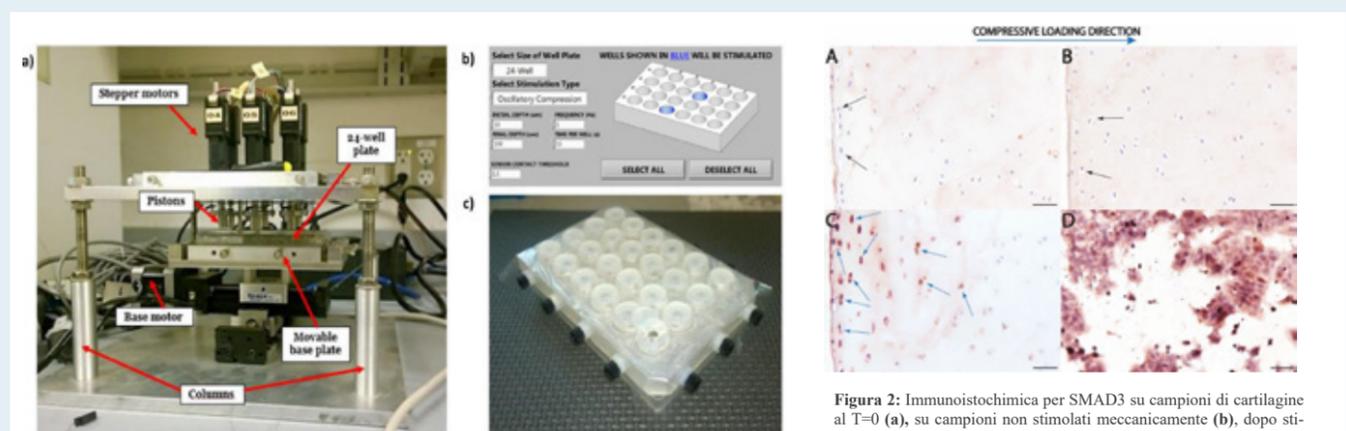


Figura 1: Immagine reale del dispositivo Hit-MACE impiegato per la stimolazione meccanica dei tessuti cartilaginei (a), screenshot del software di controllo acquisito durante la fase di set-up sperimentale (b). Coperchio customizzato in grado di mantenere le condizioni di sterilità durante gli esperimenti (c).

Figura 2: Immunoistochimica per SMAD3 su campioni di cartilagine al T=0 (a), su campioni non stimolati meccanicamente (b), dopo stimolazione fisiologica (c), e controllo positivo per SMAD3 su cellule MCF (d). Le frecce blu evidenziano la sovra espressione di SMAD3 nel campione sottoposto a regime di sollecitazione meccanica rispetto ai campioni al T=0 e non stimolati (frecce nere). Scale bar = 50 μ m.

Sviluppo di uno scaffold ingegnerizzato iperelastico per la rigenerazione dell'entesi tendinea

Riccardo Gottardi, PhD
rgottardi@fondazionerimed.com

COLLABORAZIONI

- University of Pennsylvania (UPenn), United States
- Bioengineering and Biomaterials Laboratory, Children's Hospital of Philadelphia (CHOP), United States
- Center for Cellular and Molecular Engineering (CCME), University of Pittsburgh, United States
- Department of Pediatrics, Perelman School of Medicine, University of Pennsylvania, United States
- Department of Bioengineering, School of Engineering and Applied Science, University of Pennsylvania, United States
- The Chinese University of Hong Kong, China
- Cell Biology Inspired Tissue Engineering, Institute for Technology-Inspired Regenerative Medicine, Maastricht University, Netherlands
- MERLN Institute for Technology-Inspired Regenerative Medicine, Maastricht University, Netherlands

AREA TERAPEUTICA

Patologie dell'invecchiamento

PIPELINE



BREVE DESCRIZIONE

L'entesi tendine-osso (TTBE) è una struttura composta da tessuto connettivo specializzato, essenziale per garantire una transizione graduale tra tessuto tendineo ed osseo.

Gli infortuni che interessano il TTBE hanno un'elevata incidenza clinica soprattutto negli anziani e nelle popolazioni più attive che praticano sport a vari livelli.

Ogni anno nell'UE e negli USA circa 30 milioni di persone sono sottoposte a procedure di riparazione di tendini/legamenti,

con una spesa annua di oltre 150 miliardi di euro. Nonostante le diverse tecniche innovative che sono state sviluppate, la riparazione chirurgica di lesioni da entesi massicce è ancora troppo spesso inadeguata, con un tasso di insuccesso che può arrivare al 79% nei casi più gravi.

Lo scopo di questo progetto è quello di produrre un materiale che possa migliorare gli outcomes della chirurgia riparativa delle TTBE. Per questo, abbiamo realizzato uno *scaffold* cellularizzato

IMPATTO

Con questo progetto abbiamo mirato a sviluppare un costrutto che mimica l'entesi tendine-osso per soddisfare il bisogno clinico di costrutti ad alte prestazioni da utilizzare nella chirurgia ricostruttiva dei tendini. Il nostro costrutto ingegnerizzato ha promosso la differenziazione delle cellule staminali verso fenotipi cartilaginei e tendinei. A questo scopo abbiamo utilizzato un bioreattore innovativo che è parte del portfolio di proprietà intellettuale della Fondazione. Inoltre, le proprietà ad alta resistenza dello *scaffold* PLGA iperelastico conferiscono resistenza meccanica alla nostra struttura. Quindi, il nostro costrutto può supportare la riparazione chirurgica delle lesioni ai tendini, promuovendo una rapida guarigione e migliorando i risultati post-chirurgici.

RISULTATI RAGGIUNTI NEL 2020

In questo studio, abbiamo realizzato un costrutto ingegnerizzato che riprende alcuni aspetti del tessuto di transizione fibrocartilagineo-tendineo di un'entesi tendine-osso e che può supportare la vitalità, la proliferazione e la differenziazione delle cellule. Il nostro sistema di differenziazione è basato su uno *scaffold* stampato in 3D, altamente biocompatibile, e realizzato in PLGA iperelastico caratterizzato da un'architettura microporosa. Tale architettura è caratterizzata da fibre con un orientamento allineato sul lato del tendine, e con orientamento disomogeneo sul lato cartilagineo, al fine di imitare le caratteristiche anatomiche dell'entesi nativa. Le entesi sono ingegnerizzate popolando con cellule umane mesenchimali adulte del midollo osseo, quindi coltivate all'interno di un sistema costituito da un bioreattore bifasico avanzato. Questo, ha consentito l'esposizione simultanea di ciascun lato del costrutto bifasico a uno specifico mezzo di differenziazione. I risultati dell'analisi dell'espressione genica, dell'analisi biochimica e dell'esame istologico suggeriscono che abbiamo siamo riusciti ad ottenere con successo un costrutto ingegnerizzato composto da una porzione tendine-like e da una parte cartilagine-like, che lo rende potenzialmente applicabile per la riparazione chirurgica del tendine.

che imita il tessuto di transizione bifasico tendine-fibrocartilagineo del TTBE. Il costrutto è composto da un lato simile a un tendine e un lato simile alla cartilagine, cellularizzato con cellule staminali mesenchimali umane adulte (hMSC). Il nucleo strutturale del nostro costrutto è uno *scaffold* composto da poly(L-lactide-co-glicolide) di grado medico (PLGA), con elevata porosità interna e proprietà elastiche sufficienti a formare una rete autoportante, e in grado di supportare la proliferazione cellulare.

OBIETTIVI PER IL 2021

Il costrutto sviluppato con questo lavoro ha mostrato proprietà interessanti nel dirigere la differenziazione delle hMSCs verso fenotipi della linea condrogenica e tenogena, nonché il loro corretto orientamento spaziale lungo lo *scaffold*. In studi futuri abbiamo in programma di migliorare ulteriormente le proprietà biomimetiche del nostro costrutto, inducendo una distribuzione spaziale più efficace delle hMSCs all'interno delle maglie dell'impalcatura. L'obiettivo principale è fabbricare un costrutto caratterizzato da una transizione tendine-cartilagine più definita per aumentare le loro proprietà biomimetiche.

PUBBLICAZIONI

- Gottardi, R., Möeller, K., Di Gesù, R., Tuan, R.S., van Griensven, M., Balmayor, E.R.. Application of a Hyperelastic 3D Printed Scaffold for Mesenchymal Stem Cell-based Fabrication of a Bizonal Tendon Enthesis-like Construct. *Frontiers in materials - biomaterials*, (in press). doi: 10.3389/fmats.2021.613212

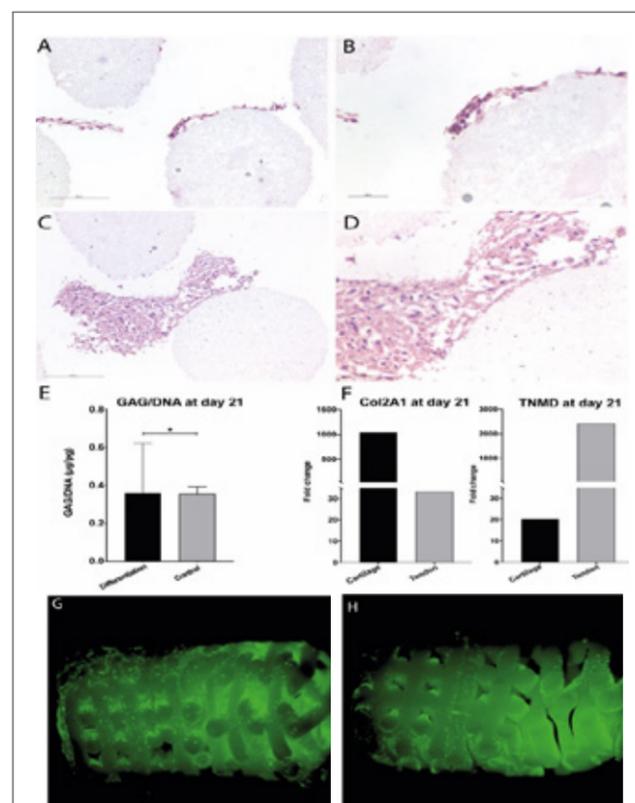


Figura 1: H&E staining del costrutto bifasico (lato cartilagineo) dopo 7 giorni (A, B) e 21 giorni (C, D) di coltura a due diversi ingrandimenti. Le frecce nere indicano la matrice extracellulare di nuova produzione. Scale bar = 150 µm (A, C) e 50 µm (B, D). Contenuto di GAG dei costrutti espresso come rapporto GAG/DNA al giorno 21. I dati sono stati analizzati tramite unpaired t test con Welch correction, * p < 0,05 (E). Espressione genica relativa di COL2A1 e TNMD al giorno 21 misurata mediante qRT-PCR (F), normalizzata rispetto al controllo nello stesso time point. Calceina AM staining selettivo per le cellule vive eseguita sull'intero costrutto (G) e su una sezione longitudinale del costrutto (H) dopo 7 giorni di coltura in bioreattore.



PIATTAFORME TECNOLOGICHE

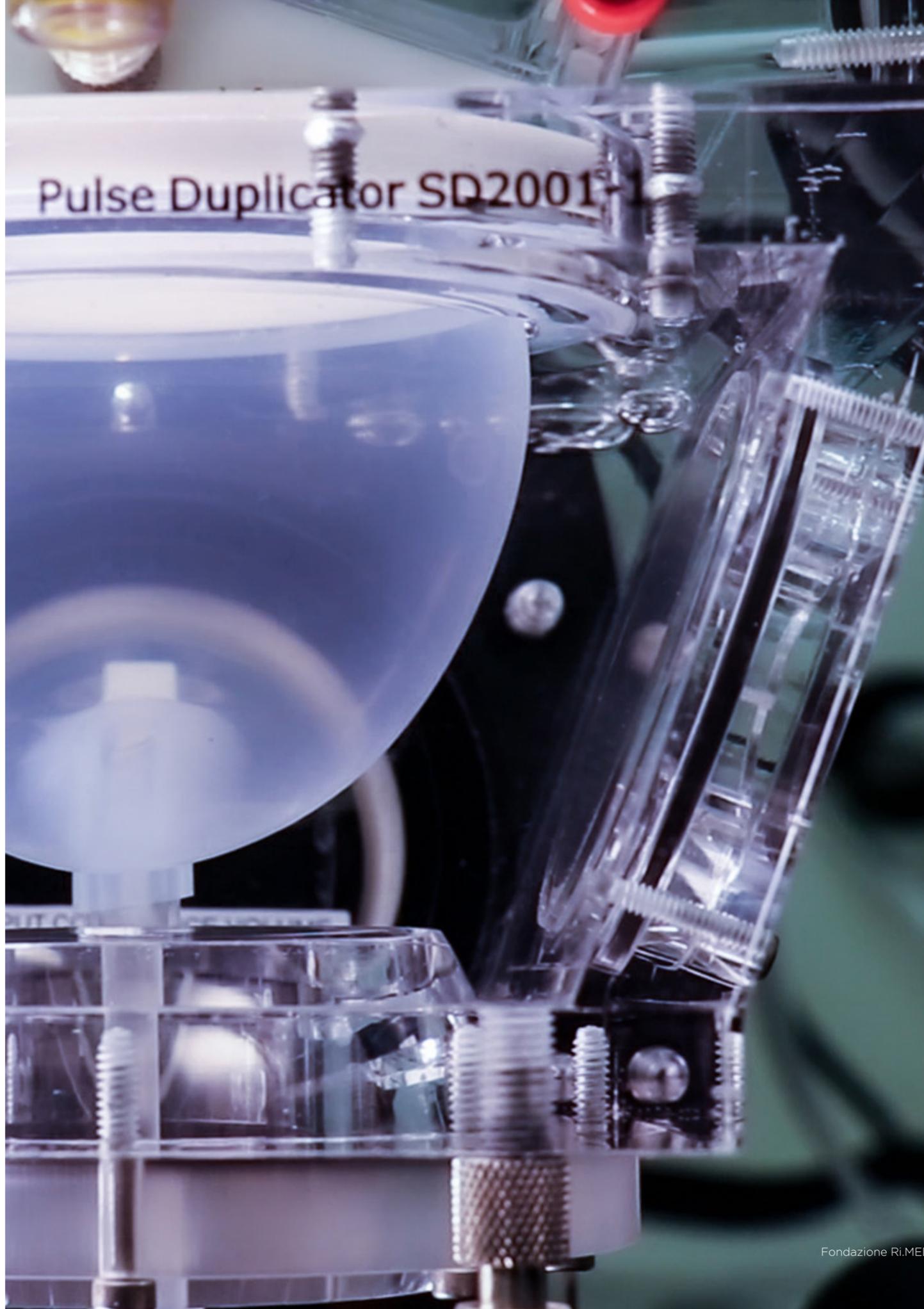
Negli ultimi anni, soprattutto grazie ai finanziamenti erogati dalla Regione Siciliana, la dotazione tecnologica delle piattaforme Ri.MED è stata notevolmente potenziata: i gruppi di **Bioinformatica** e **Informatica Molecolare** dispongono di hardware e software con velocità di screening virtuale di 5000 molecole al minuto, integrati con gli algoritmi proprietari per lo studio delle interazioni molecolari a livello cellulare e con l'infrastruttura per l'analisi delle proprietà chimicofisiche.

In dotazione anche un sistema automatizzato per la conservazione e manipolazione di librerie di molecole per il laboratorio **High Throughput Screening**, nonché un simulatore cardiaco e le strumentazioni per la caratterizzazione di biomateriali e dispositivi medici, che il gruppo di **Bioingegneria** utilizza per lo sviluppo di nuove soluzioni per i pazienti.

La piattaforma di **Biofisica e Biologia strutturale**, dedicata alla produzione e purificazione e allo studio tridimensionale delle proteine di interesse terapeutico, può vantare uno spettrometro di risonanza magnetica a 800 MHz, ancora oggi l'unico nel Sud Italia, mentre la piattaforma di **Imaging Biomedico e Radiomica** si avvale di spettrometri a 3T e 7T e competenze per l'analisi di dati e immagini multimodali, per la diagnosi predittiva di patologie e recidive.

Presso l'IRCCS, il gruppo di **Proteomica** supporta l'identificazione di nuovi target farmacologici e di biomarcatori, nonché lo studio di potenziali effetti collaterali di particolari molecole terapeutiche; è inoltre presente una **Cell factory** per la produzione di ATP.

Nel 2020 è stata allestita la Piattaforma di **Chimica Medicinale**, che consente la validazione strutturale di *hits* primari e l'espansione della famiglie chimiche, nonché l'ottimizzazione strutturale di molecole biologicamente promettenti, fino all'individuazione dei composti che entreranno in fase di sviluppo.



Bioinformatica

Bioingegneria

Biologia Strutturale e Biofisica

Cell Factory

Chimica Medicinale

High-throughput Screening (HTS)

Imaging Biomedico e Radiomica

Informatica Molecolare

Proteomica

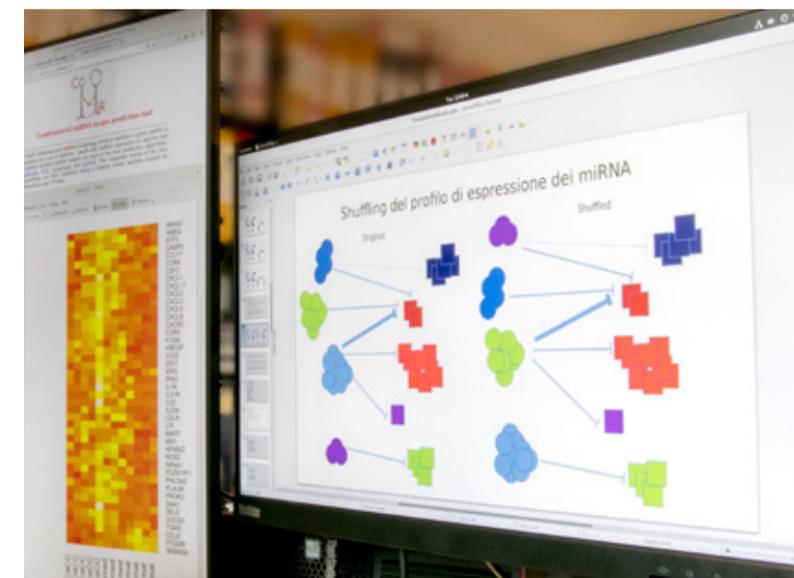
Piattaforma di Bioinformatica

CONTATTI:
Claudia Coronello, PhD
ccoronello@fondazionerimed.com

La piattaforma di Bioinformatica e Analisi Dati è dedicata 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 Biological Big Data. Ad esempio, supportiamo l'unità di Drug Discovery per il design e l'analisi dei dati generati dalla piattaforma di HTS. Eseguiamo le analisi statistiche comunemente utilizzate sui high-throughput data ottenuti da un ampio range di tecnologie, basate su *microarray* o *Next Generation Sequencing*, integrando l'analisi con i dati clinici ove presenti. Spesso le analisi standard non sono applicabili, perché i software e gli algoritmi esistenti non prevedono il disegno sperimentale pensato. In questi casi, sfruttiamo le nostre capacità di programmazione e gestione di big data per analizzare i dati con un approccio personalizzato. Principale oggetto di interesse del gruppo sono le reti di interazioni biologiche, analizzate integrando l'analisi di più sorgenti di dati. Ad esempio, siamo in grado di descrivere la rete di regolazione genica dei microRNA endogeni in un particolare tessuto di interesse, sfruttando il loro profilo di espressione genica.

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

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



Competenze

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

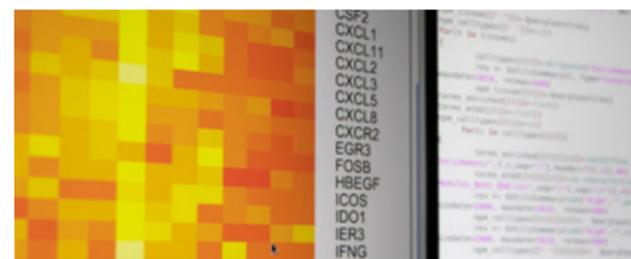
Dotazione tecnologica

Software

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

Hardware

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



PROGETTI DI RICERCA ATTIVI

OBIND - Oncological therapies through Biological Interaction Network Discovery. Progetto finanziato dalla Regione Sicilia nell'ambito del programma PO FESR - azione 1.1.5.

Il progetto si occupa di realizzare una piattaforma tecnologica per l'analisi delle interazioni biologiche tra proteine, RNA messaggeri, microRNA e molecole farmacologiche, con l'obiettivo di individuare nuove terapie per le patologie tumorali. Budget Totale finanziato: 1.967.779,70 Euro; di cui per la Fondazione Ri.MED 540.000,00 Euro.

PUBBLICAZIONI

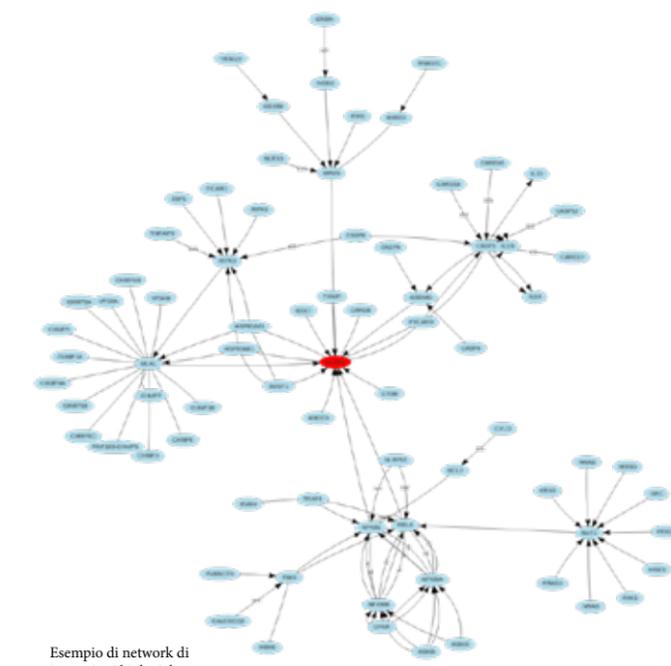
Bellavia, D, Iacovoni, A, Agnese, V, Falletta, C, Coronello, C, Pasta, S, Novo, G, di Gesaro, G, Senni, M, Maalouf, J, Sciacca, S, Pilato, M, Simon, M, Clemenza, F, Gorcsan III, S.J. (2020) *Usefulness of regional right ventricular and right atrial strain for prediction of early and late right ventricular failure following a left ventricular assist device implant: A machine learning approach*, The International Journal of Artificial Organs 43 (5), 297-314. doi.org/10.1177/0391398819884941

Cilluffo, D, Barra, V, Spatafora, S, Coronello, C, Contino, F, Bivona, S, Feo, S, Di Leonardo, A. (2020) *Aneuploid IMR90 cells induced by depletion of pRB, DNMT1 and MAD2 show a common gene expression signature*, Genomics 112 (3), 2541-2549. doi.org/10.1016/j.ygeno.2020.02.006

Kvorjak, M, Ahmed, Y, Miller, ML, Sriram, R, Coronello, C, Hashash, JG, Hartman, DJ, Telmer, CA, Miskov-Zivanov, N, Finn, OJ, Cascio, S (2020) *Cross-talk between Colon Cells and Macrophages Increases ST6GALNAC1 and MUC1-sTn Expression in Ulcerative Colitis and*

Colitis-Associated Colon Cancer. Cancer immunology research 8 (2), 167-178. doi.org/10.1158/2326-6066.CIR-19-0514

Cicero, L, Cirincione, R, Comelli, A, Coronello, C, Cassata, G, *Residue analysis of a synthetic glucocorticoid in liver samples by a 1HMR spectroscopy approach: An exploratory study on animal model*, Food Additives & Contaminants. Part A 37 (10), 1640-1650, doi.org/10.1080/194440049.2020.1787528



Esempio di network di interazioni biologiche

Piattaforma di Bioingegneria

CONTATTI:
Gaetano Burriesci, PhD
gburriesci@fondazionerimed.com

La Piattaforma di Bioingegneria consente il trattamento e la caratterizzazione di biomateriali, la simulazione numerica di sistemi fisiologici complessi e la validazione preclinica di dispositivi medici delle varie classi di rischio (da classe I - a classe III).

Il personale tecnico-scientifico offre solide competenze nella modellazione numerica, nell'analisi fluido-strutturale, nell'ottimizzazione progettuale dei dispositivi medici e nella conduzione delle verifiche precliniche, basate sui requisiti regolamentari e sulla good practice.

Nel medio termine, l'unità ambisce ad affermarsi come riferimento per gli enti del sistema sanitario, i centri accademici e le piccole e medie imprese sul territorio, stimolando la produzione di innovazione clinica da parte dalle eccellenze locali ed offrendo percorsi di crescita per nuove competenze tecniche e gestionali nel settore.

COLLABORAZIONI:

- IRCCS - ISMETT, Palermo, Italia
- Policlinico Giaccone, Palermo, Italia
- Università degli Studi di Palermo, Italia
- Università degli studi di Padova, Italia
- Université de Technologie de Compiègne, Francia
- Barts Heart Centre at St Bartholomew's Hospital, Regno Unito
- Great Ormond Street Hospital for Children, Regno Unito
- University College London, Londra, Regno Unito
- Queen Mary University of London, Regno Unito
- University of Bristol, Regno Unito

Laboratorio di Bioingegneria



Competenze

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

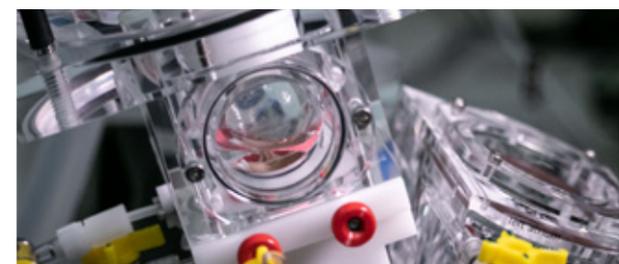
Dotazione tecnologica

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



PROGETTI DI RICERCA ATTIVI

- Sviluppo di una valvola cardiaca transcateretere innovativa.
- Sviluppo di una valvola cardiaca in tessuto animale priva di Alfa-Gal.
- Analisi dell'appendice atriale sinistra per la predizione del rischio di trombosi.
- Simulazioni numeriche Smoothed Particle Hydrodynamics (SPH) per applicazioni di bioingegneria cardiovascolare.
- Caratterizzazione termomeccanica di biomateriali superelastici Ni-Ti.



PUBBLICAZIONI

- Tango AM, Ducci A, **Burriesci G.** *In silico study of the ageing effect upon aortic valves. Accepted for publication in Journal of Fluids and Structures*
- Vella D, Monteleone A, Musotto G, Bosi GM, **Burriesci G.** *Effect of the alterations in contractility and morphology produced by atrial fibrillation on the thrombosis potential of the left atrial appendage.* Front. Bioeng. Biotechnol. doi: 10.3389/fbioe.2021.58604
- Annio G, Franzetti G, Bonfanti M, Gallarelo A, Palombi A, De Momi E, Homer-Vanniasinkam S, Wurdemann HA, Tsang V, Diaz-Zuccarini V, Torii R, Balabani S, **Burriesci G.** *Low cost fabrication of PVA based personalized vascular phantoms for in vitro haemodynamic studies: three applications.* ASME J of Medical Diagnostics. doi: <https://doi.org/10.1115/1.4045760>
- Rahmani B, **Burriesci G.** *Polymeric Heart Valves.* In: Roberts G., Watts A., European Biophysical Societies (eds) Encyclopedia of Biophysics. Springer, Berlin, Heidelberg. https://doi.org/10.1007/978-3-642-35943-9_702-1
- **Burriesci G.**, Seifalian AM, Zervides C. *Heart Valve Prosthesis* US10357358B2
- Salsac AV, Fiore A, **Burriesci G.** *Implant pour valve cardiaque* FR1858233
- Tseng, YT, Latif N, El-Nashar H, Salmon J, Sarathchandra P, **Burriesci G.**, Sohler J, Chester A, Yacoub M. *Design and pre-clinical testing of a tissue engineered semilunar root.* 2nd International Conference of Tissue-Engineered Heart Valves, 14 February 2020, Abu Dhabi, United Arab Emirates
- Annio G, Torii R, Ducci A, Muthurangu V, Tsang V, **Burriesci G.** *Enhancing Magnetic Resonance Imaging with CFD: in vitro validation and patient specific application.* VPH 2020, Paris, 24-28 September 2020

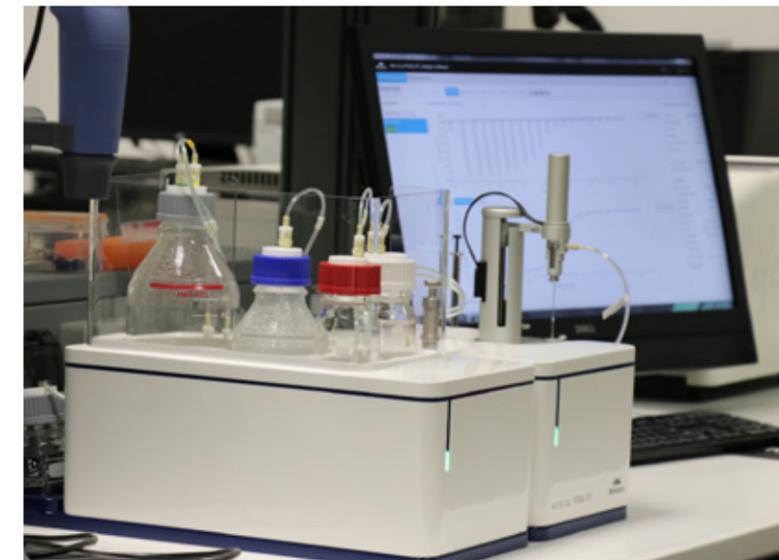
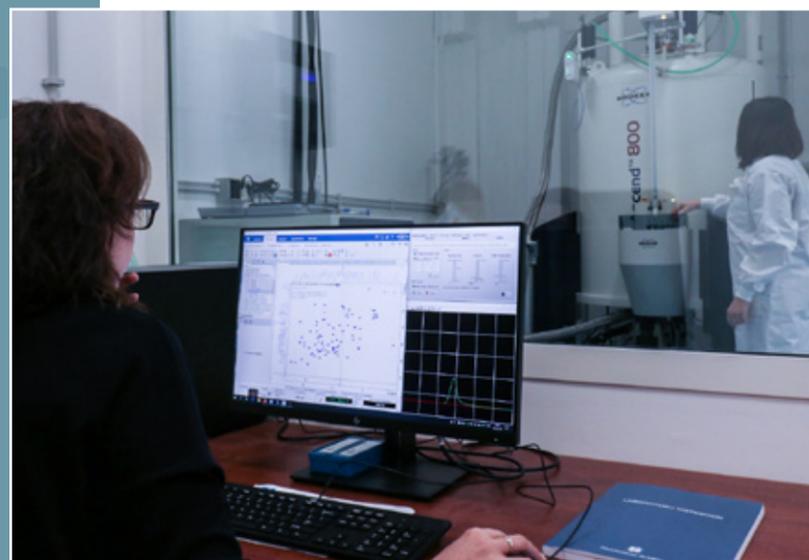
Piattaforma di Biologia Strutturale e Biofisica

CONTATTI:
Caterina Alfano, PhD
calfano@fondazionerimed.com

La piattaforma di Biologia Strutturale e Biofisica fornisce un supporto cruciale nello sviluppo di potenziali farmaci basati su piccole molecole, nello sviluppo di anticorpi terapeutici e nello sviluppo di vaccini a base di proteine ricombinanti. La Piattaforma è inoltre fondamentale per lo studio a livello atomico di meccanismi molecolari, chiarendo le relazioni struttura / funzione di proteine coinvolte in percorsi patologici. Per raggiungere questi scopi, la piattaforma è fornita di apparecchiature all'avanguardia che consentono un approccio multi-tecnica come la risonanza magnetica nucleare, il microscio circolare, la calorimetria e l'interferometria. Nel 2021 la piattaforma sarà ulteriormente implementata per la cristallizzazione di proteine e per studi di oligomerizzazione e aggregazione di proteine. La piattaforma supporta diversi progetti di ricerca in diverse aree terapeutiche come malattie dell'invecchiamento, cancro, malattie infettive e applicazioni biomediche. La diversità di tutti i progetti di ricerca in corso rappresenta bene il potenziale della Biologia Strutturale che può essere applicata sia alla ricerca di base che alla scienza traslazionale e può supportare trasversalmente diverse attività di ricerca.

COLLABORAZIONI:

- King's College London, Londra, Regno Unito
- TES Pharma, Perugia, Italia
- Scuola Normale Superiore of Pisa, Italia
- Università degli Studi di Perugia, Italia
- Università degli studi della Campania "Luigi Vanvitelli", Napoli, Italia
- Università degli Studi di Palermo, Italia
- Istituto di Biofisica (IBF) - (CNR), Palermo, Italia
- International Covid-19 NMR Consortium



Competenze

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

Dotazione tecnologica

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

PROGETTI DI RICERCA ATTIVI

- Studio dei meccanismi molecolari alla base delle patologie da misfolding proteico.
- Delucidazione dei meccanismi di legame di molecole in grado di interferire con il processo di oligomerizzazione di NPM1.
- Sviluppo di molecole adesive bio-ispirate in grado di funzionare in ambienti acquosi.
- Studi strutturali e biofisici su KDM4a, proteina coinvolta nella regolazione epigenetica di patologie tumorali.
- Ruolo dell'interazione alpha-sinucleina/membrane nel morbo di Parkinson.



- Produzione di proteine da *Klebsiella pneumoniae* per lo sviluppo di vaccini.
- BLI- e NMR-based fragment screening.
- Studi sulla relazione struttura/funzione in proteine di SARS-CoV-2.

PUBBLICAZIONI

Astoricchio E., **Alfano C.**, Rajendran L., Temussi P., Pastore A. (2020) *The Wide World of Coacervates: From the Sea to Neurodegeneration*. Trends Biochem Sci, 45(8):706-717.

Puglisi R., Brylski O., **Alfano C.**, Martin S.R., Pastore A., Temussi P. (2020) *Quantifying the thermodynamics of protein unfolding using 2D NMR spectroscopy*. Comm Chemistry, doi: 10.1038/s42004-020-00358-1.

Altincekic N., Korn S.M., Qureshi N.S., Dujardin M., Ninot-Pedrosa, Abele R., Abi Saad M.J., **Alfano C.**, Monaca E., Sabbatella R., Schlundt A. (2021) *Large-scale recombinant production of the SARS-CoV-2 proteome for high-throughput and structural biology applications*. Frontiers in Molecular Biosciences, Accepted.

Dudás E.F., Puglisi R., Korn S.M., **Alfano C.**, Bellone M.L., Dal Piaz F., Kelly G., Monaca E., Schlundt A., Schwalbe H., Pastore A. (2021) *Backbone chemical shift spectral assignments of SARS coronavirus-2 non-structural protein nsp9*. Biomolecular NMR Assignments, Accepted.



Piattaforma CELL FACTORY

CONTATTI:
Chiara Di Bartolo, MSc
cdibartolo@fondazionerimed.com

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

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

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



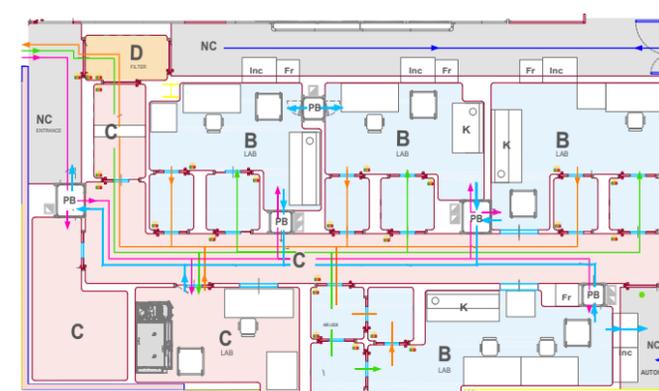
Competenze

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

Descrizione degli ambienti

La nuova cell factory, completata nel 2020, garantisce flessibilità nella tipologia di produzioni e funzionalità degli ambienti. Sulla base di specifiche User Requirement Specification sono stati sviluppati (ed approvati da AIFA durante un incontro di Scientific Advice) layout di aree di produzione e controllo per le tre tipologie di terapie avanzate (Terapia genica, Terapia cellulare somatica, Ingegneria dei Tessuti). Sono stati realizzati 4 laboratori di classe B, di cui uno a maggior contenimento (con con autoclave passante per il trattamento dei rifiuti). Gli altri 3 laboratori di classe B possono essere utilizzati in maniera totalmente indipendente, permettendo la preparazione simultanea di tre prodotti differenti, o possono essere resi comunicanti a due a due di modo che in un primo laboratorio vengano svolte parte delle operazioni (ad es. la pulizia di un organo) e nel secondo (passando l'intermedio di produzione tramite passbox) le altre manipolazioni (ad es. isolamento e coltura). Inoltre,

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



Layout della GMP Facility, con flussi del personale e dei materiali

ATTIVITÀ

I lavori della nuova Cell Factory e dei laboratori Controllo Qualità sono stati completati al momento di stesura di questo report (Dic 2020). E' stata installata nelle suddette aree la maggior parte degli strumenti e si sta provvedendo al completamento degli arredi. E' stata effettuata la qualifica del sistema di monitoraggio degli strumenti. Nel 2021 si completeranno le qualifiche del sistema di filtrazione dell'aria (HVAC) e di tutta la strumentazione standard (incubatori, cappe, frigo, congelatori, centrifughe e termostati).

Il personale Cell Factory eseguirà nel corso del 2021 le convalide di processi generali fondamentali (convalida vestizione, sanitizzazione e clean hold time, passaggio materiali ecc.) ai fini dell'autorizzazione della struttura. Una volta disponibili i necessari dati di sviluppo/trasferimento tecnologico dei primi prodotti di terapia avanzata (nell'ambito delle terapie immunoadottive), verranno effettuate convalide specifiche del processo produttivo e dei correlati metodi di controllo qualità. Un prodotto di terapia avanzata ed il suo uso clinico verranno presentati come parte integrante della domanda di autorizzazione alla produzione nella nuova struttura.

Prosegue la redazione della documentazione del sistema di qualità fondamentale per l'autorizzazione della struttura e l'aggiornamento della formazione del personale interno ed esterno che avrà accesso alla Cell Factory.



Piattaforma di Chimica Medicinale

CONTATTI:
Maria De Rosa, PhD
mderosa@fondazionerimed.com

Il gruppo di Chimica Medicinale si occupa della progettazione e sintesi di nuove molecole (di natura peptidica, peptidomimetica e a più basso peso molecolare - *small molecules*) biologicamente attive su target terapeutici validati nell'ambito di una patologia; e quindi della preparazione di librerie di composti e collezione di building blocks. L'obiettivo finale è la scoperta di nuovi farmaci di interesse terapeutico. La piattaforma di Chimica Medicinale fa anche da supporto all'unità di Drug Discovery della Fondazione Ri.MED, durante le fasi iniziali delle campagne di *screening*, e in particolare nelle attività di validazione e conferma strutturale di hits primari, re-sintesi degli stessi ed espansione della famiglia chimica; e nelle fasi successive di ottimizzazione strutturale di molecole biologicamente promettenti, fino all'individuazione di uno o più composti che di fatto entreranno nella fase di sviluppo, o meglio noti come composti *lead*.

Le principali attività della piattaforma comprendono la progettazione di nuove molecole, la sintesi organica, nonché la caratterizzazione strutturale delle stesse. Il processo di ottimizzazione strutturale di hits consiste invece nello studio approfondito della cosiddetta relazione struttura attività (esplorazione della SAR) che ha come scopo ultimo un miglioramento del profilo farmacocinetico dei composti di interesse (potenza, efficacia, tossicità, selettività, solubilità e permeabilità). La piattaforma usa tecniche classiche e moderne di sintesi organica anche ricorrendo a sistemi automatizzati per librerie più ampie di molecole, con il vantaggio di ridurre notevolmente i costi e i tempi durante le varie fasi dell'intero *work-flow* e che include: a) il *set-up* delle reazioni; b) il *work-up* e la purificazione delle miscele di reazione; c) l'isolamento dei composti di interesse; d) la caratterizzazione analitica e strutturale delle molecole; e) la valutazione del grado di purezza dei campioni che andranno allo *screening* biologico.

COLLABORAZIONI:
Università degli studi della Campania "Luigi Vanvitelli", Napoli, Italia



Competenze

- Progettazione di molecole;
- Sintesi organica (anche assistita dalle microonde);
- Sintesi in fase solida;
- Chimica di *small molecules*, peptidi e peptidomimetici;
- Chimica combinatoriale;
- Purificazione di miscele di reazione complesse, in fase normale e inversa;
- Elucidazione e caratterizzazione strutturale;
- Controllo qualità dei campioni.

Dotazione tecnologica

- Sistema di purificazione dell'acqua: Produzione di acqua pura e ultra-pura per applicazioni analitiche.
- Apparecchio per flash cromatografia: Isolamento e purificazione su fase normale e inversa di composti di interesse a partire da miscele complesse di reazione.
- Cromatografia liquida ad alta risoluzione (HPLC): Applicazioni di tipo semi-preparativo e determinazione dello standard di purezza.
- Cromatografia liquida accoppiata alla massa (LC-MS): Monitoraggio delle reazioni chimiche e analisi di miscele complesse



Implementazione della dotazione tecnologica:

- Reattore di microonde (MW): Trasformazioni catalitiche in fase omogenea ed eterogenea.
- Sistema di purificazione dei solventi: Rapida e sicura produzione di solventi anidri, necessari per reazioni che richiedono l'ambiente inerte.
- Sintetizzatore automatico di peptidi: Preparazione di dozzine di peptidi contemporaneamente.
- Liofilizzatore: Rimozione del contenuto di acqua da campioni di analisi.



PROGETTI DI RICERCA ATTIVI

- Progettazione e sintesi di nuovi potenziali inibitori dell'Inflammasoma NLRP3, target validato per le malattie dell'invecchiamento
- Progettazione e sintesi di nuovi potenziali inibitori selettivi di KD-M4A, come farmaci anti-tumorali.

PUBBLICAZIONI

- *Dynamic-shared pharmacophore approach as tool to design new allosteric PRC2 inhibitors, targeting EED binding pocket.* Lombino, J.; Gulotta, M. R.; De Simone, G.; Mekni, N.; **De Rosa, M.**; Carbone, D.; Parrino, B.; Cascioferro, S. M.; Diana, P.; Padova, A.; Perricone, U. Mol. Inf. 2020, 39, 1-10.
- *Targeting SARS-CoV-2 RBD Interface: A Supervised Computational Data-Driven Approach to Identify Potential Modulators.* Gulotta, M. R.; Lombino, J.; Perricone, U.; De Simone, G.; Mekni, N.; **De Rosa, M.**; Diana, P.; Padova, A. ChemMedChem 2020, 15, 1-12.
- *In silico insights towards the identification of NLRP3 druggable hot spots.* Mekni, N.; **De Rosa, M.**; Cipollina, C.; Gulotta, M. R.; De Simone, G.; Lombino, J.; Padova, A.; Perricone, U. Inter. J. Mol. Sci. 2019, 20, 4974 (1-13).

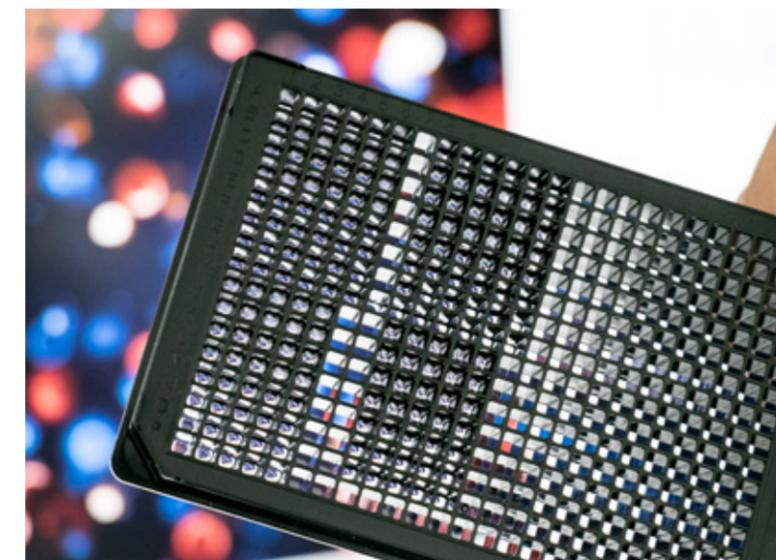
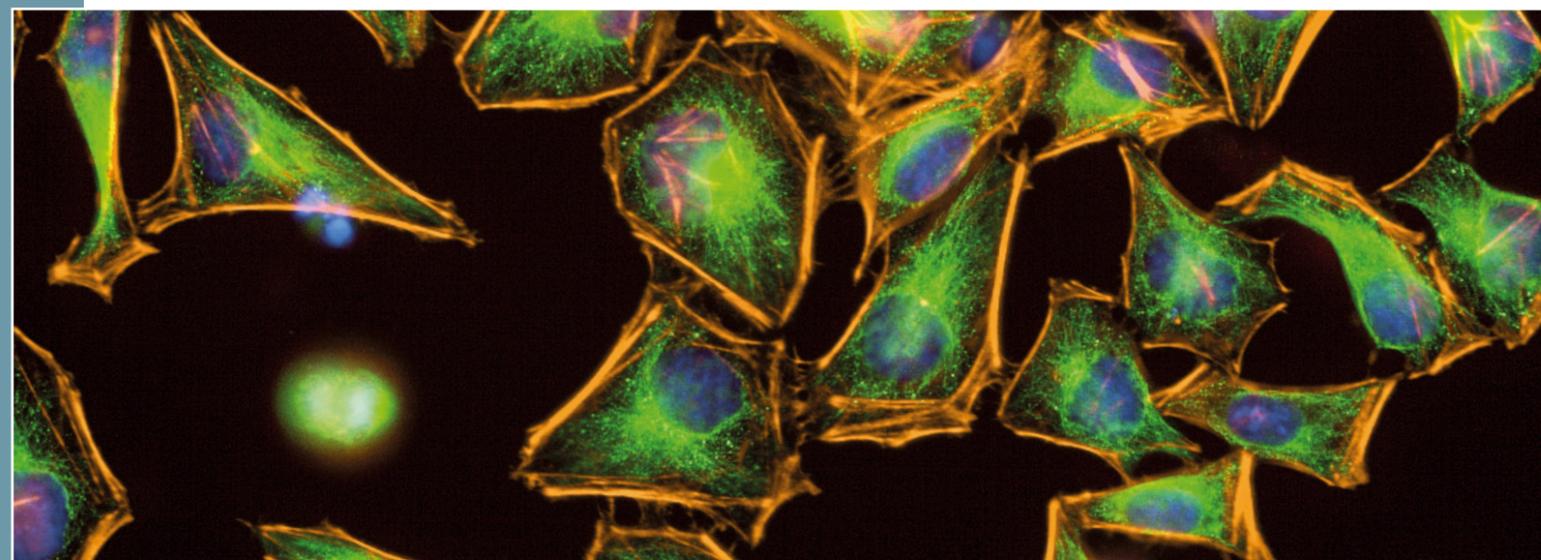
Piattaforma di High- throughput Screening

CONTACTS:
Chiara Cipollina, PhD
ccipollina@fondazionerimed.com

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

COLLABORAZIONI:

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



Competenze

- Set-up e validazione di saggi primari biochimici e cellulari;
- Saggi con readout differenti tra cui: assorbanza, luminescenza e TR-FRET;
- Miniaturizzazione (384-well plates);
- High-content imaging (HCI);
- Screening/high-content screening (HCS);
- Analisi dei dati e selezione degli hit primari;
- Hit picking per validazione degli hit primari attraverso curve dose-risposta;
- Saggi ortogonali e saggi secondari;
- Saggi di tossicità.

Dotazione tecnologica

- Wet lab per biologia cellulare e molecolare;
- EL406 (Biotek) - automatic microplate washer/dispenser;
- Aquamax 4000 - automatic microplate washer for gentle cell washing;
- Operetta-CLS (Perkin Elmer) - high-content imaging system;
- Spark (Tecan) - multimode microplate reader;
- In-Hood-Bravo (Agilent) - liquid handling system.



PROGETTI DI RICERCA ATTIVI

- *Sviluppo di inibitori dell'enzima Istone Lysine-specific demethylase 4A (Kdm4A) per nuove terapie antitumorali.*

Il progetto ha come obiettivo la scoperta di nuove molecole in grado di inibire con efficacia e selettività l'enzima Kdm4A. Nell'ambito di questo progetto utilizzeremo un saggio enzimatico primario per lo screening di librerie di molecole selezionate attraverso un approccio di "virtual screening".

Dopo aver completato con successo le fasi di ottimizzazione, miniaturizzazione e validazione del saggio primario, la prima campagna di screening è stata avviata a Dicembre 2020;

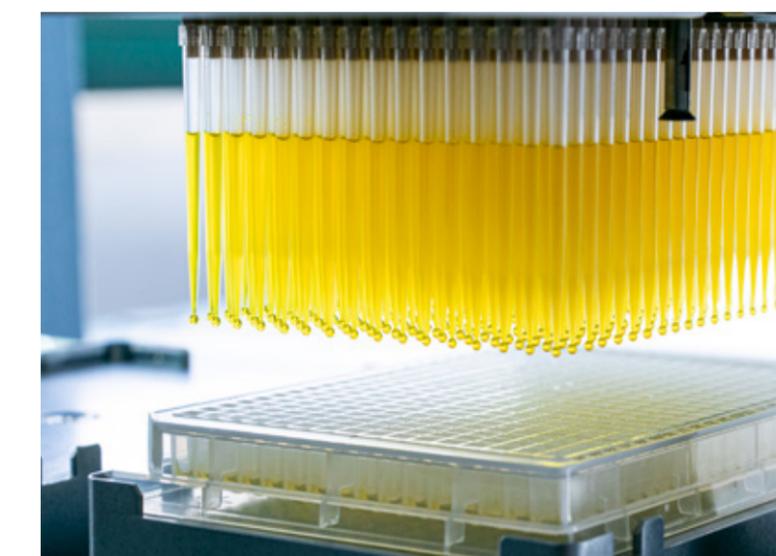
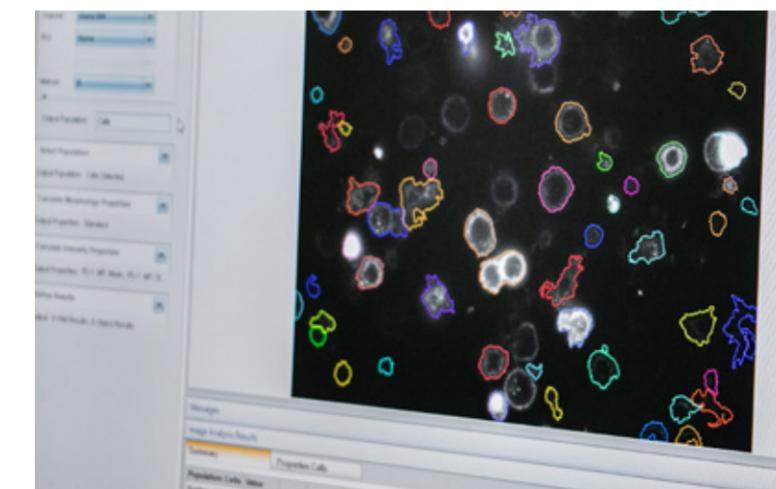
- *Sviluppo di inibitori selettivi del recettore intracellulare NLRP3 per il trattamento di patologie croniche associate all'invecchiamento.*

Il progetto ha come obiettivo la scoperta di nuove molecole in grado di inibire l'attivazione di NLRP3. Il saggio primario che verrà utilizzato in questa campagna di screening è un saggio fenotipico in cui viene misurato il rilascio della citochina IL-1 β da macrofagi umani in seguito ad attivazione selettiva dell'inflammasoma NLRP3. Nel corso del 2020 il saggio primario è stato ottimizzato e miniaturizzato ed è stata avviata la fase di validazione.

E' stato inoltre messo a punto un saggio ortogonale che misura il rilascio di lattato deidrogenasi (LDH) e che verrà utilizzato per la conferma dei primary actives.

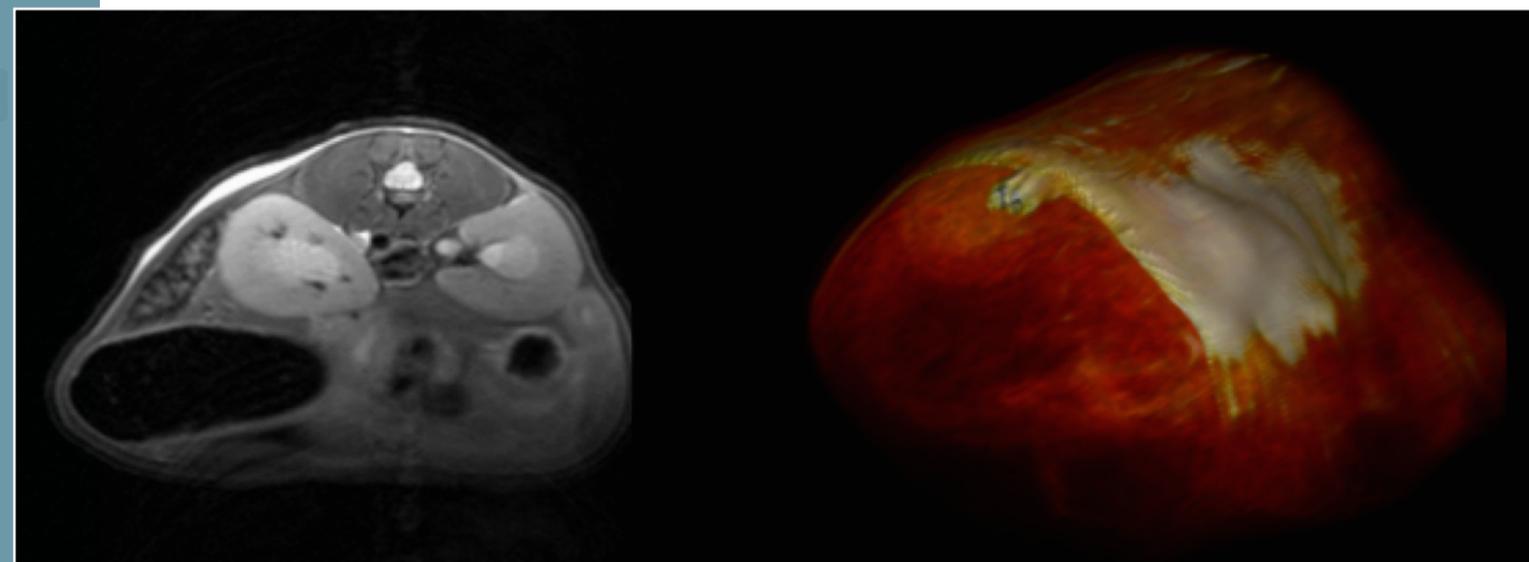
PUBBLICAZIONI

Cellular Models and Assays to Study NLRP3 Inflammasome Biology. Zito G, Buscetta M, Cimino M, Dino P, Bucchieri F, Cipollina C. Int J Mol Sci. 2020 Jun 16;21(12):4294. doi: 10.3390/ijms21124294.



Piattaforma di Imaging Biomedico e Radiomica

CONTATTI:
Albert Comelli, PhD
acomelli@fondazionerimed.com



Durante il 2020, la piattaforma di Imaging Biomedico e Radiomica ha utilizzato due metodi di risonanza magnetica (3T e 7T), un sistema di *imaging Spectrum In Vivo* (Bioluminescenza) e Tomografia a emissione di positroni - Tomografia computerizzata (PET / CT) messi a disposizione dalle istituzioni partecipanti. Sono stati sviluppati strumenti di pre-elaborazione, segmentazione, radiomica e intelligenza artificiale (*machine learning* e *deep learning*) da immagini per diagnosi predittiva di patologie e supporto diagnostico medico in collaborazione con GIT e IBFM-CNR.

La piattaforma di Imaging Biomedico e Radiomica fornisce un supporto cruciale per promuovere la traduzione dei risultati scientifici in applicazioni cliniche, in particolare per le neuroscienze e la ricerca sul cancro. Lo staff, in aumento, è oggi composto da un informatico esperto in elaborazione ed analisi di immagini biomediche, e in acquisizione di risonanze magnetiche cliniche e precliniche, un fisico, un veterinario e un dottorando in medicina nucleare. Durante il 2021, la piattaforma sarà arricchita con due Workstation con GPU e due monitor 4k per *Deep Learning* e *Machine Learning Algorithms* al fine di offrire più opzioni per l'imaging *in vivo* e l'analisi dei dati.

COLLABORAZIONI:

- Istituto Mediterraneo per i Trapianti (IRCCS ISMETT), Palermo, Italia
- Istituto di Bioimmagini e Fisiologia Molecolare, (IBFM-CNR), Cefalù, Italia
- Georgia Institute of Technology, (GIT), Atlanta, USA
- Unità di Medicina Nucleare, Università di Messina, Italia
- Dip. di Promozione della Salute, Medicina Interna e Specialità Mediche, (PROMISE), Università di Palermo, Italia
- Dipartimento di Biomedicina, Neuroscienze e Diagnostica avanzata (BIND), Università di Palermo, Palermo, Italia
- Dipartimento di Ingegneria, Università di Palermo, Italia
- Dip. di Scienze Agrarie, Alimentari e Forestali, Università di Palermo, Italia
- Unità di Fisica Medica, Ospedale Cannizzaro, Catania, Italia
- Dip. di Medicina Nucleare, Ospedale Cannizzaro, Catania, Italia
- Istituto Zooprofilattico Sicilia (IZS), Palermo, Italia

Competenze

- Modelli di elaborazione delle immagini (RM / PET / TC / IVIS e istologici), segmentazione 3D, apprendimento profondo e apprendimento automatico per estrarre, classificare e delineare i volumi tumorali e funzioni radiomiche per la diagnosi predittiva di patologie (es. Tumore, COVID19) e ricadute e Supporto per decisioni mediche;
- Risonanza magnetica (T1, T2, DP, DWI, ADC e DCE);
- Tomografia ad emissione di positroni / Tomografia computerizzata (PET/TC);
- Spettroscopia su fantocci, campioni *in vivo* ed *ex vivo*;
- Progettazione e creazione di fantocci per spettroscopia, agenti di contrasto e studi morfologici.

Dotazione tecnologica

Presso l'Istituto Zooprofilattico Sperimentale:

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

Presso IRCCS ISMETT:

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

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

- PET/CT Clinica e Preclinica.

PROGETTI DI RICERCA ATTIVI

- *Imaging in vivo di piccoli animali* a supporto del Progetto Immunoterapia NK-mediata per il trattamento e/o la prevenzione della recidiva HCC e/o HCV post-trapianto, supervisionato dalla Dott.ssa Ester Badami.
- *Classificazione diagnostica di microemorragie/calcificazioni* utilizzando caratteristiche radiomiche e algoritmi intelligenti artificiali su sequenze di risonanza magnetica cerebrale ponderata per la suscettibilità (SWI). ISMETT: Dr. Roberto Miraglia e Dr. Gianvincenzo Sparacia. Fondazione Ri.MED: Dr. Albert Comelli e Dr.ssa Claudia Coronello.
- *Classificazione diagnostica del grado di ipertensione portale nei pazienti con cirrosi* utilizzando caratteristiche radiomiche e algoritmi intelligenti artificiali sulla CT. ISMETT: Dott. Roberto Miraglia e Dott. Giuseppe Mamone. Fondazione Ri.MED: Dr. Albert Comelli e Dr.ssa Claudia Coronello.
- *Studio di spettroscopia fantasma dei metaboliti su MRI 3 tesla clinica e MRI 7 Tesla preclinica.* ISMETT: Dr. Roberto Miraglia e Dr. Fabio Calogero Caruso. Fondazione Ri.MED: Dr. Albert Comelli e Dr.ssa Claudia Coronello.



PUBBLICAZIONI

- Barone S, Chakhunashvili A, **Comelli A** (2020). *Building a statistical surveillance dashboard for COVID-19 infection worldwide*. QUALITY ENGINEERING, vol. 32, p. 754-763, ISSN: 0898-2112, doi: 10.1080/08982112.2020.1770791.
- Alongi P, Stefano A, **Comelli A**, Laudicella R, Barone S and Russo G. (2020). *New Artificial intelligence model for 18F-Choline PET/CT in evaluation of high-risk prostate cancer outcome: texture analysis and radiomics features classification for prediction of disease progression*. Journal of Nuclear Medicine, 61(supplement 1), 1303-1303.
- Cannella R, Vernuccio F, **Comelli A**, Salvaggio G and Midiri M. (2020). *Texture analysis for noninvasive assessment of hepatic fibrosis: current knowledge and future perspectives*. European Congress of Radiology 2020.
- Cicero L, Cirincione R, **Comelli A**, Coronello C, Cassata G (2020). *Residue analysis of a synthetic glucocorticoid in liver samples by a 1HMR spectroscopy approach: An exploratory study on animal model*. FOOD ADDITIVES & CONTAMINANTS. PART A. CHEMISTRY, ANALYSIS, CONTROL, EXPOSURE & RISK ASSESSMENT, vol. 37, p. 1640-1650, ISSN: 1944-0049, doi: 10.1080/19440049.2020.1787528.



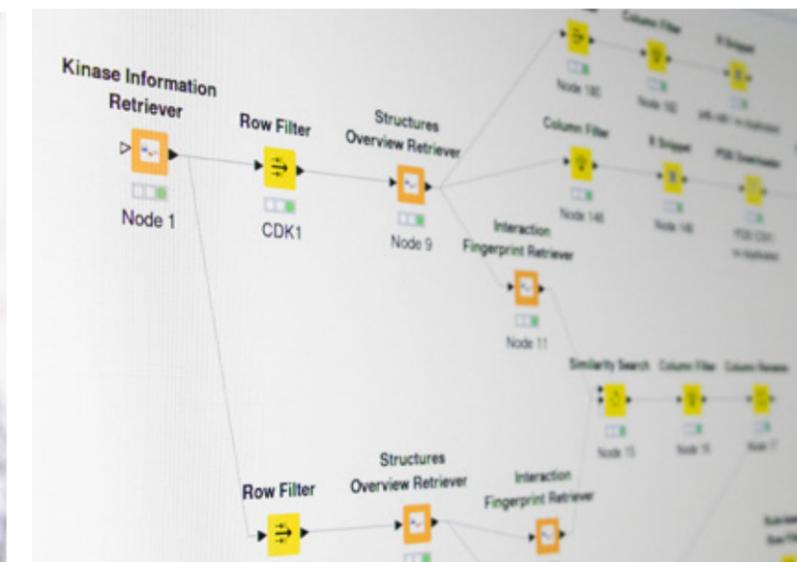
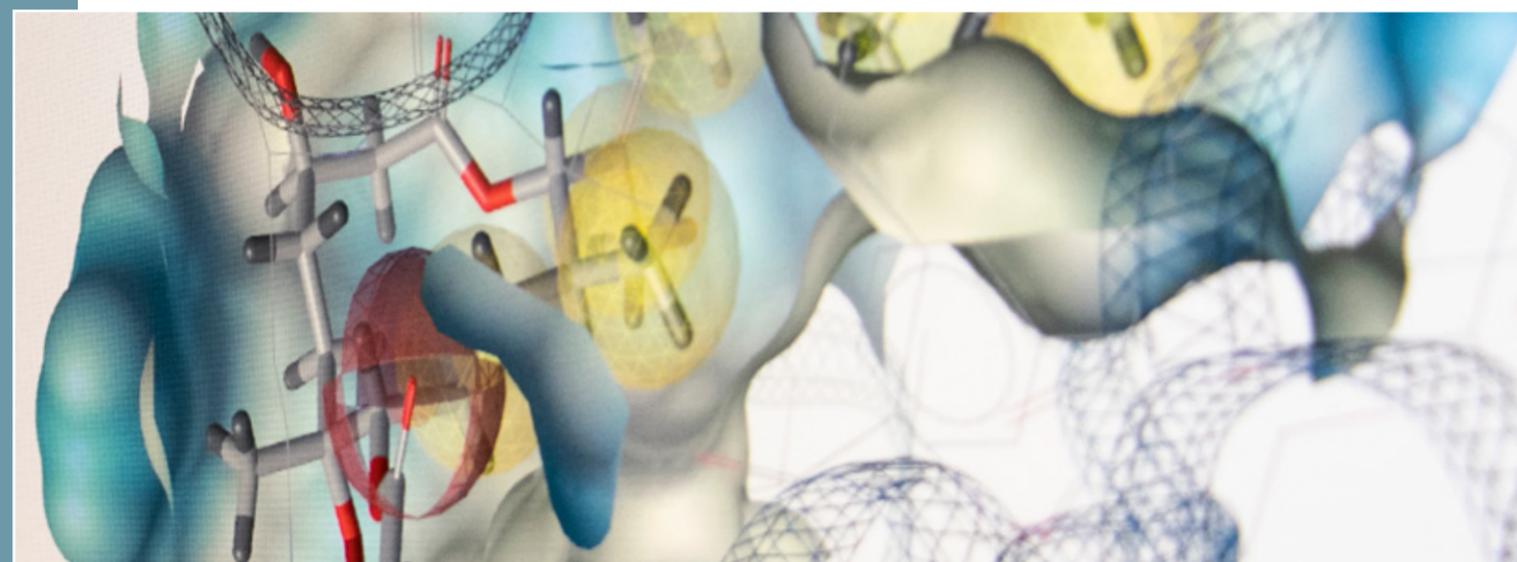
Piattaforma di Informatica Molecolare

CONTATTI:
Ugo Perricone, PhD
uperricone@fondazionerimed.com

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

COLLABORAZIONI:

- Institut de La Vision, Parigi, Francia
- Università di Vienna (Dip. di Chimica Farmaceutica), Austria
- University of Pittsburgh, Stati Uniti
- Università di Napoli Federico II, Italia
- Consiglio Nazionale delle Ricerche IRIB-CNR, Palermo, Italia
- Università di Palermo, Italia



Competenze

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

Dotazione tecnologica

Software

- Schrodinger suite for *small molecule* drug discovery;
- LigandScout expert suite;
- Autodock and Autodock Vina;
- Desmond (OPLS2005 and OPLS3e);
- AMBER;
- NAMD;
- VMD;
- Gromacs;
- RDKit;
- KNIME.

Hardware

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

Capacità di calcolo:

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

Piattaforma integrata *in silico*

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

PROGETTI DI RICERCA ATTIVI

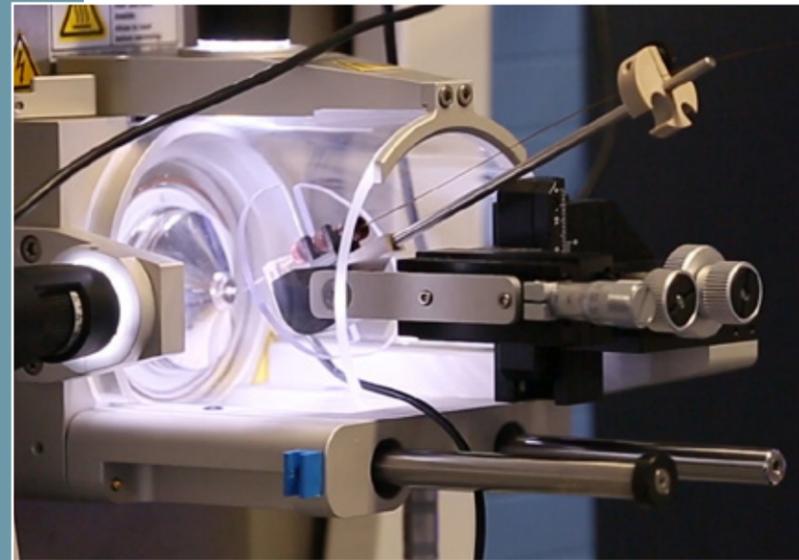
- Progettazione di inibitori selettivi del *target* **CD14** coinvolto nella maculopatia degenerativa legata all'età.
- Progettazione di inibitori di **NLRP3** quale *target* della patologia infiammatoria.
- Ricerca di modulatori di proteine coinvolte nella regolazione epigenetica della patologia tumorale (**KDM4, EZH2**).
- Progettazione e sviluppo di inibitori della **CDK1** coinvolta nelle patologie tumorali.
- Progettazione modulatori dell'interazione proteina-proteina con particolare riferimento ai complessi **MUC1-CIN85**.
- Studio del meccanismo d'azione dei derivati peptidici della spirulina su patologie cardiovascolari.
- Progettazione di inibitori della **Main protease (Mpro) SARS-CoV-2**.
- Creazione di algoritmi di *deep learning* e *machine learning* per profiling *in silico*.

PUBBLICAZIONI

- Jessica Lombino, Maria Rita Gulotta, Giada De Simone, Nedra Mekni, Maria De Rosa, Daniela Carbone, Barbara Parrino, Stella Maria Cascioferro, Patrizia Diana, Alessandro Padova, and **Ugo Perricone**, *Dynamic-shared pharmacophore approach as tool to design new allosteric PRC2 inhibitors, targeting EED binding pocket*, 2020, Molecular Informatics, doi: 10.1002/minf.202000148.
- Giulia Culetta, Maria Rita Gulotta, **Ugo Perricone**, Maria Zappalà, Anna Maria Almerico, Marco Tutone, *Exploring the SARS-CoV-2 Proteome in the Search of Potential Inhibitors via Structure-Based Pharmacophore Modeling/Docking Approach*, Computation 2020, 8, 77, doi: 10.3390/computation8030077.
- Maria Rita Gulotta, Jessica Lombino, **Ugo Perricone**, Giada De Simone, Nedra Mekni, Maria De Rosa, Patrizia Diana, Alessandro Padova, *Targeting SARS-CoV-2 RBD interface: a supervised computational data-driven approach to identify potential modulators*, 2020, ChemMedChem 2020 Jul 23. doi: 10.1002/cmcd.202000259.
- Jose A Souto, Federica Sarno, Angela Nebbioso, Chiara Papulino, Rosana Álvarez, Lucia Altucci, Jessica Lombino, **Ugo Perricone**, Alessandro Padova, Ángel R. De Lera, *A new family of JmjC-containing domain KDM inhibitors inspired on natural product purpurogallin*, 2020, Front Chem May 25;8:312. doi: 10.3389/fchem.2020.00312.
- Isabella Mendolia, M.D; Salvatore Contino; **Ugo Perricone**; Edoardo Ardiccione; Roberto Pirrone, *Convolutional Architectures for Virtual Screening*, 2020, BMC Bioinformatics, doi https://doi.org/10.1186/s12859-020-03645-9.
- Cascioferro S., Li Petri G., Parrino B., El Hassouni B., Carbone D., Arizza V., **Perricone U.**, Padova A., Funel N., Peters G.J., Cirrincione G., Giovannetti E., and Diana P., *3-(6-Phenylimidazo [2,1-b][1,3,4]thiadiazol-2-yl)-1H-Indole Derivatives as New Anticancer Agents in the Treatment of Pancreatic Ductal Adenocarcinoma*, Molecules 2020, 25, 329; doi:10.3390/molecules25020329.

Piattaforma di Proteomica

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



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

COLLABORAZIONI:

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

Competenze

- Concentrazione di proteine da terreni condizionati;
- Misura spettrofotometrica (Bradford, BCA, micro BCA);
- Precipitazione e analisi chimica del campione;
- Digestione triptica in gel ed in soluzione;
- Preparazione di peptidi con metodo FASP;
- STAGE (STop And Go Extraction) Tip;
- Sample CleanUp;
- Frazionamento in base al pH;
- Secretome protein enrichment with click sugars (SPECS);
- Proteomica quantitativa LRFQ;
- Western Blot;
- SDS-PAGE;
- Analisi qualitativa e quantitativa di proteine mediante cromatografia liquida/spettrometria di massa per proteomica "Bottom Up" e "Shot-gun".

Dotazione tecnologica

Strumentazione:

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

Software:

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

PROGETTI DI RICERCA ATTIVI

iRhom2: a new therapeutic target for osteoarthritis

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

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

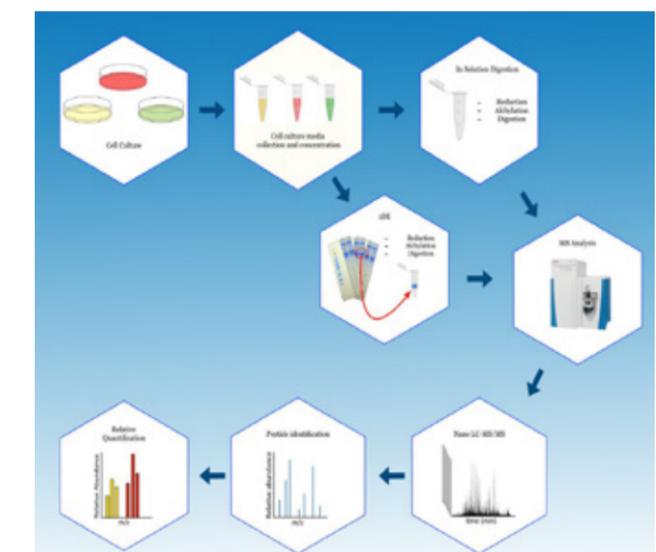
Sia TNF che LRP1 sono due proteine transmembrana che vengono rilasciate nello spazio extracellulare in seguito a taglio proteolitico mediato da ADAM17. È chiaro quindi come l'inibizione di ADAM17 possa avere effetti positivi sulla progressione dell'artrosi. Tuttavia, ADAM17 regola il rilascio di più di 80 proteine, e quindi una sua inibizione totale provoca effetti collaterali dovuti alla deregolazione dei livelli di tali queste proteine. Due omologhi inattivi delle proteasi romboidi, conosciuti come iRhom1 e iRhom2, sono dei regolatori essenziali di ADAM17, in quanto ne mediano la maturazione attraverso il *pathway* secretorio, e indirizzano l'attività catalitica dell'enzima verso specifiche proteine transmembrana. Grazie all'utilizzo di proteomica quantitativa, abbiamo scoperto che la maggior parte dei substrati di ADAM17 vengono rilasciati sia quando l'enzima è in complesso con iRhom1 che iRhom2. Al contrario, TNF e LRP-1 vengono tagliati da ADAM17 solo quando l'enzima è in complesso con iRhom2. Per questo motivo, l'inibizione farmacologica di iRhom2 potrebbe dare effettivi positivi nella terapia dell'artrosi, con bassi rischi di effetti collaterali dal momento che l'attività di ADAM17 verso tutti gli altri substrati può essere supportata da iRhom1. Dimostrare quest'ipotesi è lo scopo principale di questo progetto.

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

Le molecole di classe I del complesso maggiore d'istocompatibilità sono presenti in tutte le cellule nucleate e svolgono un ruolo fondamentale nell'esporre gli antigeni peptidici per il loro riconoscimento da parte delle cellule del sistema immunitario innato. Grazie all'utilizzo della proteomica quantitativa abbiamo scoperto che i livelli di superficie delle molecole di classe I sono regolati da iRhom2. Lo studio del meccanismo molecolare con cui iRhom2 regola le molecole di classe I e le conseguenze funzionali *in vivo* di questo meccanismo di regolazione sono l'obiettivo principale di questo progetto.

PUBBLICAZIONI

- Calligaris M, Cuffaro D, Bonelli S, Spanò DP, Rossello A, Nuti E, **Scilabra SD**. *Strategies to Target ADAM17 in Disease: From its Discovery to the iRhom Revolution*. *Molecules*. 2021 Feb 10;26(4):944. doi: 10.3390/molecules26040944. PMID: 33579029.
- Yang CY, Chanalaris A, Bonelli S, McClurg O, Hiles GL, Cates AL, Zarebska JM, Vincent TL, Day ML, Müller SA, Lichtenthaler SF, Nagase H, **Scilabra SD**, **Troeberg L**. *Interleukin 13 (IL-13)-regulated expression of the chondroprotective metalloproteinase ADAM15 is reduced in aging cartilage*. *Osteoarthr Cartil Open*. 2020 Dec;2(4):100128. doi: 10.1016/j.ocarto.2020.100128. PMID: 33381768; PMCID: PMC7762825.
- Carreca AP, Pravatà VM, Markham M, Bonelli S, Murphy G, Nagase H, Troeberg L, **Scilabra SD**. *TIMP-3 facilitates binding of target metalloproteinases to the endocytic receptor LRP-1 and promotes scavenging of MMP-1*. *Sci Rep*. 2020 Jul 21;10(1):12067. doi: 10.1038/s41598-020-69008-9. PMID: 32694578; PMCID: PMC7374751.
- *Quantitative mass spectrometry based secretome analysis as a tool to investigate metalloprotease and TIMP activity*. *Methods in Molecular Biology*, 2020, 2043:265-273



Generalized mass spectrometry based proteomic workflow

FINANZIAMENTI PER LA RICERCA

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

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

Nel corso dell'anno 2020 sono proseguite le attività relative ai 9 progetti pluriennali finanziati nel 2018 e nel 2019 ed in corso di svolgimento. Il 2020 ha visto l'ammissione a finanziamento di 3 nuovi progetti di Ricerca e Sviluppo, a valere su finanziamenti regionali (PO FERS 2014-2020) e nazionali (PON MIUR e PON MISE). Ri.MED, inoltre, è stata eletta *host institution* nell'ambito del prestigioso "ERC Consolidator Grant".

Tra le attività del 2020 volte all'ottenimento di finanziamenti per la ricerca, va segnalata la sottomissione di 2 progetti a valere su bando europeo HORIZON 2020, 4 progetti di Ricerca e Sviluppo su finanziamenti nazionali (MUR) e 1 progetto sul bando di diffusione della cultura scientifica (MUR).

Sono state inoltre presentate 10 proposte di Dottorati innovativi a caratterizzazione industriale: di queste, 7 sono state finanziate. Sempre nell'ambito delle borse di formazione è stata finanziata anche una borsa di ricerca e formazione dall'INPS.



Progetti scientifici in corso di svolgimento nel 2020

CheMIST

Computational Molecular Design e Screening

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

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

INFRASTRUTTURE DI RICERCA - "GMP Facility, Laboratori di Ricerca e Servizi Diagnostici e Terapeutici dell'Istituto Mediterraneo per i Trapianti e le Terapie ad Alta Specializzazione"
Finanziato da: Assessorato alle Attività Produttive della Regione Siciliana

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

OACTIVE

Advanced personalised, multi-scale computer models preventing OsteoArthritis

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

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

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

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

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

PROGEMA

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

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

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

PROMETEO

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

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

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

Piano delle attività "TRASFERIMENTI PER METODOLOGIE INNOVATIVE NEL CAMPO DELLE BIOTECNOLOGIE 2018"

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

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

OBIND

Oncological therapies through Biological Interaction Network Discovery

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

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

Progetto iRhom2

"iRhom2 a new therapeutic target in osteoarthritis"

Finanziato da: Fondazione con il Sud - Bando Capitale Umano adAlta qualificazione 2018

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

Progetti scientifici ammessi a finanziamento nel 2020

SENSO

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

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

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

4FRAILITY

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

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

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

NABUCCO

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

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

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

BIOMITRAL

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

Finanziato da: Commissione Europea HORIZON 2020 - ERC Consolidator Grant

L'obiettivo del progetto è quello di sviluppare un innovativo prototipo di valvola mitrale che prevede l'ingegnerizzazione dell'apparato cordale e il collegamento del ventricolo sinistro con i lembi della valvola.

Progetti scientifici sottomessi nel 2020

PORTRAIT

Personalized healthcare data storage and analysis platform to support non-invasive diagnosis of liver steatosis, fibrosis and inflammation in NAFLD by artificial intelligence

Bando: H2020-SC1-2020- HORIZON 2020 - European Commission

L'obiettivo del progetto è quello di creare nuovi strumenti per una valutazione accurata, non invasiva e personalizzata della progressione della steatopatie non alcolica (NASH) attraverso l'ingegnerizzazione di un *framework* in grado di raccogliere e aggregare dati clinici provenienti da diversi ospedali europei e l'utilizzo di tecniche di *machine learning* e *deep learning*.

JEDI GRANDCHALLENGE - BILLION MOLECULES AGAINST COVID-19

Bando della Joint European Disruptive Initiative (JEDI).

L'obiettivo del progetto è quello di identificare tramite screening *in silico* potenziali composti in grado di inibire tre diversi target terapeutici associati al Coronavirus.

Incontra Ri.MED un'esperienza dentro i laboratori di ricerca

Bando: Diffusione della cultura scientifica - MUR

L'obiettivo del progetto è quello di fornire agli studenti delle scuole superiori una visione coinvolgente ed interattiva su tematiche inerenti la ricerca biomedica e biotecnologica, con un focus sull'impatto del covid-19 sulla salute dell'uomo.

La Fondazione ha partecipato in qualità di consulente al bando 2020 Fondo Integrativo Speciale per la Ricerca, FISR-MIUR COVID 19, con i seguenti progetti:

- SAAB: Targeting di geni che causano la malattia da SARS-CoV-2.
- DROPS: Sviluppo di una piattaforma avanzata per la valutazione sistemica di dispositivi di protezione individuale
- SEMAR: Sensore nano-strutturato per stress ossidativo integrato in mascherina per valutazione in remoto
- SOAR-MIA: Strategia operativa di allarme rapido mediante monitoraggio statistico dei dati epidemiologici e Intelligenza Artificiale

PROPRIETÀ INTELLETTUALE E TRASFERIMENTO TECNOLOGICO

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

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

Oltre al deposito delle nuove domande di brevetto ed alla gestione del portfolio esistente, nel corso del 2020 Ri.MED ha completato l'acquisizione di una famiglia brevettuale da UCL Business PLC, divisione Business di UCL (University College London) e che vede tra gli inventori Gaetano Burriesci, Group Leader di Bioingegneria della Fondazione. Tale famiglia brevettuale è costituita da due brevetti aventi ad oggetto due valvole cardiache e dal brevetto del correlato *delivery system* ed è in corso la negoziazione per la sua concessione in licenza e sviluppo con una company cinese.





Portfolio Brevetti al 31.12.2020

SVILUPPO DI NUOVI FARMACI

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

WO2019100021

Fondazione Ri.MED - Università di Pittsburgh

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

WO2018067709

Fondazione Ri.MED - Università di Pittsburgh

MEDICINA RIGENERATIVA E IMMUNOTERAPIA

NK-mediated immunotherapy and uses thereof

WO2018099988

Fondazione Ri.MED - IRCCS ISMETT

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

WO2018175234

Fondazione Ri.MED - Università di Pittsburgh

Extracts for the regeneration of ligaments

PCT/US2019/019119

Fondazione Ri.MED - Università di Pittsburgh

INGEGNERIA DEI TESSUTI E DISPOSITIVI MEDICI

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

WO2018220573

Fondazione Ri.MED - IRCCS ISMETT

Transatrial access for intracardiac therapy

WO2017127682

Fondazione Ri.MED - Università di Pittsburgh

Bi-layer extra cellular matrix scaffolds and uses thereof

WO2017044787

Fondazione Ri.MED - Università di Pittsburgh

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

WO2016138416

Fondazione Ri.MED - Università di Pittsburgh

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

WO2016138423

Fondazione Ri.MED - Università di Pittsburgh

Multi-layered graft for tissue engineering applications

WO2019023447

Fondazione Ri.MED - Università di Pittsburgh

Treating soft tissue via controlled drug release

WO2015134770

Fondazione Ri.MED - Università di Pittsburgh

Microfluidic Tissue Development Systems

WO2017062629

Fondazione Ri.MED - Università di Pittsburgh

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

WO2015027186

Fondazione Ri.MED - Università di Pittsburgh

Recruitment of mesencymal stem cells using controlled release systems

WO2014022685

Fondazione Ri.MED - Università di Pittsburgh

Osteoarthritis treatment with chemokine-loaded alginate microparticles

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

Fondazione Ri.MED - Università di Pittsburgh

Organ chip to model mammalian joint

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

Fondazione Ri.MED - Università di Pittsburgh

Multi-well mechanical stimulation systems and incubators

WO2019079722

Fondazione Ri.MED - Università di Pittsburgh

A stentless biopolymer heart valve replacement capable of living tissue regeneration

WO2018156856

Fondazione Ri.MED - Università di Pittsburgh

An expandable percutaneous cannula

PCT/US2018/017795

Fondazione Ri.MED - Università di Pittsburgh

Biodegradable metallic - polymeric composite prosthesis for heart valve replacement

WO2019210059

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

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

US provisional Patent Application 62/874,114

Fondazione Ri.MED - Università di Pittsburgh

Valved stent for the treatment of tricuspid regurgitation

US provisional Patent Application 62/868,275

Fondazione Ri.MED - Università di Pittsburgh

Semi-rigid annuloplasty ring and method of manufacturing

WO2019220365

Fondazione Ri.MED

Heart valve prosthesis

WO2010112844

Fondazione Ri.MED

Prosthesis delivery system

WO2012052718

Fondazione Ri.MED

Prosthetic heart valve

WO2016203241

Fondazione Ri.MED

WORK IN PROGRESS



CBRB

Centro per le Biotecnologie e la Ricerca Biomedica

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

Stampato da OFFSET STUDIO di Serraino Angelo & C.SNC. - Palermo
Marzo 2021



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