



Fondazione
Ri.MED

REPORT
SCIENTIFICO
2021



SOCI FONDATORI



*Presidenza
del Consiglio dei Ministri*



Regione Siciliana



Consiglio Nazionale
delle Ricerche



PARTNER



IMMAGINE DI COPERTINA:

Coltura in vitro di cellule NK ottenute a partire dal perfusato epatico di donatore cadavere. L'immagine al microscopio mostra cellule NK a giorno 21 di coltura. Le cellule NK amano crescere in clusters.

IL POLO MEDITERRANEO PER LA RICERCA TRASLAZIONALE



Alessandro Padova
DIRETTORE GENERALE

Nel corso del 2021 la Fondazione Ri.MED ha ulteriormente consolidato le attività volte al perseguimento delle proprie missioni statutarie: i lavori di costruzione di CBRB sono proseguiti a ritmo costante, con il completamento dei lavori delle fondamenta, e parallelamente è stato avviato lo studio del progetto esecutivo di Ismett 2. Prosegue infatti la transizione verso una nuova struttura organizzativa necessaria per accogliere le sfide future in linea con la visione strategica del **Cluster UPMC-IRCCS ISMETT-Ri.MED**. Le strutture amministrativo-gestionali e di ricerca e sviluppo sono state riallineate ed è stato implementato un processo di valutazione delle prestazioni per il 2021.

Gli effetti della pandemia, sebbene impattanti su tutti i fronti, sono stati ridotti al minimo grazie al grande sforzo, impegno e passione di tutte le persone di Ri.MED. Sono stati raggiunti importanti risultati rispetto ai nostri obiettivi istituzionali in termini di ricerca traslazionale e formazione. I team di ricerca Ri.MED, supportati dagli uffici amministrativi, sono stati altamente produttivi in termini di programmi di ricerca e sviluppo, ricevendo riconoscimenti per la loro eccellenza e attirando finanziamenti pubblici e privati. Nel corso del 2021 Ri.MED ha sottoscritto un accordo di Licenza e Collaborazione basato su royalties per la famiglia di brevetti Triskele.

Come sempre, vorrei ringraziare il Direttore Scientifico di Ri.MED Dario Vignali per la proficua collaborazione e i Membri del Comitato Scientifico per i consigli nello sviluppo di una visione per la ricerca traslazionale Ri.MED.

Seguendo la visione del Presidente Paolo Aquilanti ed in una stretta collaborazione con il Dott. Angelo Luca, Direttore dell'IRCCS ISMETT, recentemente nominato Vice Presidente di Ri.MED, nel corso del 2021 sono state avviate alcune iniziative volte a favorire un'ulteriore integrazione del Cluster UPMC- ISMETT-Ri.MED in termini di ricerca e sviluppo, *project financing*, risorse umane e amministrazione generale.

Grazie a tutti i membri del Consiglio di Amministrazione di Ri.MED, ed in particolare alla guida strategica del Presidente Paolo Aquilanti. Un riconoscimento speciale va al Professor Bruno Gridelli, Vice Presidente della Fondazione Ri.MED, da poco in pensione. Il professor Gridelli ha avuto un ruolo unico nel plasmare il nostro passato, presente e futuro. Un ultimo ringraziamento al nostro consulente legale Giuseppe Mazzeola e al suo studio per discussioni costruttive e quotidiane su tutti i fronti ed in particolare nel processo verso la realizzazione del CBRB.

Alessandro Padova



Dario Vignali
DIRETTORE SCIENTIFICO

La missione della Fondazione Ri.MED è tradurre la ricerca biotecnologica e biomedica in nuove cure per i pazienti, anche grazie alle partnership strategiche con l'IRCCS ISMETT e con i nostri soci fondatori, a partire da UPMC. La mission di Ri.MED è anche quella di facilitare la selezione, la formazione ed il training della prossima generazione di scienziati biomedici italiani.

Gli attuali progetti di ricerca traslazionale mirano a soddisfare i bisogni terapeutici in quattro aree di ricerca: cancro (con particolare attenzione all'immunoterapia), insufficienza d'organo (che include trapianto di organi e medicina rigenerativa), patologie legate all'invecchiamento (con particolare attenzione alla neurodegenerazione) e malattie infettive.

Siamo grati per l'impegno e gli sforzi del nostro Comitato Scientifico - Prof. Lucia Altucci, Prof. Ivet Bahar, Prof. Antonino Cattaneo, Prof. Francesco Dieli e Prof. Fadi Lakkis – che lavora in modo coscienzioso e costruttivo per sviluppare le linee strategiche di ricerca e garantire la nostra competitività a livello nazionale e internazionale, al fine di massimizzare la traslazione dei risultati scientifici in sperimentazioni cliniche e fornire un significativo impatto socio-economico a livello regionale e nazionale.

Il protrarsi della pandemia di COVID-19 per tutto il 2021, ha motivato i nostri scienziati a proseguire nel parallelo sforzo di affiancare ai programmi scientifici propri della Fondazione i nuovi progetti di ricerca focalizzati su SARS-COV-2.

I nostri ricercatori hanno contribuito allo sforzo di ricerca globale, proseguendo i progetti e le collaborazioni avviati nel 2020, come la caratterizzazione strutturale delle proteine SARS-COV-2, la selezione di molecole di piombo mirate contro SPIKE e Mpro e l'identificazione di microRNA espressi nei tessuti polmonari. Ri.MED ha inoltre organizzato un proprio simposio virtuale sul tema: **"COVID-19: mechanistic dissection, drug development and clinical evaluation"**.

L'impegno per l'eccellenza e per la crescita dei nostri ricercatori, l'ambiente internazionale e multidisciplinare e la ricca rete di collaborazioni sono i fattori che ci rendono orgogliosi di essere parte di Ri.MED e del suo progetto.

Dario Vignali

INDICE

Ri.MED OVERVIEW

6

Formazione	8
Diffusione del sapere scientifico	10
Public engagement	12
Networking	14
CBRR	16
Un centro integrato di Ricerca e Cura	18
The importance of being a cluster	20
Ri.MED Research Retreat	22
Gruppi di Ricerca Ri.MED	24

Ri.MED IN PRIMA LINEA CONTRO IL COVID-19

28

SVILUPPO DI NUOVI FARMACI

32

Sviluppo di anticorpi neutralizzanti contro SARS-CoV-2 <i>Caterina Alfano, PhD</i>	34
Identificazione e caratterizzazione delle interazioni tra SARS-CoV-2 e proteine LaRP <i>Caterina Alfano, PhD</i>	36
Meccanismi molecolari delle malattie da misfolding proteico <i>Caterina Alfano, PhD</i>	38
Studi strutturali e biofisici per sondare l'interazione di KDM4a con potenziali inibitori <i>Caterina Alfano, PhD</i>	40
Il ruolo delle sequenze ripetute nella senescenza cellulare e nell'invecchiamento <i>Walter Arancio, PhD</i>	42
Ruolo degli inflammasomi nell'infiammazione polmonare associata al fumo di sigaretta <i>Chiara Cipollina, PhD</i>	44
Sviluppo di algoritmi di IA per l'estrazione e la selezione di caratteristiche radiomiche dalle immagini biomediche <i>Albert Comelli, PhD</i>	46
Sviluppo di algoritmi per modellizzare il network di interazione di microRNA e relativi target <i>Albert Comelli, PhD</i>	48
Sviluppo di algoritmi per modellizzare il network di interazione di microRNA e relativi target <i>Claudia Coronello, PhD</i>	50

Progettazione e sintesi di nuovi potenziali inibitori di KDM4a <i>Maria De Rosa, PhD</i>	52
Progettazione e sintesi di nuovi potenziali inibitori dell'Inflammasoma NLRP3 <i>Maria De Rosa, PhD</i>	54
Progettazione di inibitori non covalenti di NLRP3 nella patologia infiammatoria <i>Ugo Perricone, PhD</i>	56
Progettazione di modulatori della Istone lisina demetilasi 4 (KDM4) come agenti antitumorali <i>Ugo Perricone, PhD</i>	58
iRhom2: un nuovo target terapeutico in osteoartrite? <i>Simone Dario Scilabra, PhD</i>	60
iRhom2 regola il rilascio delle molecole MHC di classe I <i>Simone Dario Scilabra, PhD</i>	62
Ruolo di iRhom2 nella regolazione dei livelli delle molecole del complesso maggiore di istocompatibilità di classe I e nella risposta dell'adenocarcinoma pancreatico all'immunoterapia <i>Simone Dario Scilabra, PhD</i>	64
OBIND - Oncological therapies through Biological Interaction Network Discovery <i>Claudia Coronello, PhD - Ugo Perricone, PhD</i>	66

MEDICINA RIGENERATIVA E IMMUNOTERAPIA

68

I laboratori Ri.MED di Medicina Rigenerativa e Immunoterapia insieme ad IRCCS ISMETT	70
Ingegnerizzazione delle cellule CAR-NK per il trattamento dell'epatocarcinoma cellulare <i>Ester Badami, PhD</i>	71
Cellule Dendritiche regolatorie nella prevenzione del rigetto di organo <i>Ester Badami, PhD</i>	74
Secretoma di cellule mesenchimali stromali umane nel trattamento di ferite cutanee croniche: soluzioni di rilascio a base di biomateriali <i>Cinzia Chinnici, PhD</i>	76
Creazione di banche di cellule staminali pluripotenti indotte (iPSCs) patient-specific: modelli <i>in vitro</i> per terapia genica e drug discovery <i>Cinzia Chinnici, PhD</i>	78

Ottimizzazione di una terapia anti-fibrotica per fegato a base di vescicole extracellulari (EVs) e microRNAs: soluzioni di rilascio a base di biomateriali <i>Cinzia Chinnici, PhD</i>	80
Il cordone ombelicale umano nell'ambito del progetto PROMETEO: da tessuto scartato a possibile fonte di cura <i>Simona Corrao, PhD</i>	82
Sviluppo e caratterizzazione di un dotto biliare bioingegnerizzato <i>Maria Giovanna Francipane, PhD - Mattia Pasqua, PhD</i>	84
Sviluppo di un modello di osteoartrite <i>ex vivo</i> sensibile ad inibitori di mTORC1 attraverso la riduzione dello stress ossidativo e la promozione di meccanismi autofagici <i>Riccardo Gottardi, PhD - Roberto Di Gesù, PhD</i>	86
Linfociti T multi-virus specifici per il trattamento delle infezioni virali post trapianto <i>Monica Miele, PhD</i>	88
Cellule staminali mesenchimali per le malattie del fegato: sviluppo di una possibile terapia per prevenire la peritonite batterica spontanea in pazienti con cirrosi epatica <i>Mariangela Pampalone</i>	90

BIOINGEGNERIA E INGEGNERIA DEI TESSUTI

92

Sviluppo di bio-adesivi non tossici per ambienti acquosi <i>Caterina Alfano, PhD</i>	94
Sviluppo di una valvola cardiaca transcateretere innovativa <i>Gaetano Burriesci, PhD</i>	96
Analisi dell'appendice atriale sinistra per la predizione del rischio di trombosi <i>Gaetano Burriesci, PhD</i>	98
Simulazioni numeriche Smoothed Particle Hydrodynamics (SPH) per applicazioni di bioingegneria cardiovascolare <i>Gaetano Burriesci, PhD</i>	100
Caratterizzazione termomeccanica di biomateriali superelastici Ni-Ti <i>Gaetano Burriesci, PhD</i>	102
Sviluppo di sensori elettrochimici innovativi per il rilevamento di biomarcatori <i>Chiara Cipollina, PhD</i>	104
Bioreattori per l'elaborazione e deposizione di matrice extracellulare (BE-ECM) <i>Antonio D'Amore, PhD</i>	106

Modelli numerici per la meccanica e la crescita tissutale di tessuti nativi ed ingegnerizzati (NET-MTG) <i>Antonio D'Amore, PhD</i>	108
Analisi strutturale ed istopatologica per immagini di tessuti nativi ed ingegnerizzati (NET-IBA) <i>Antonio D'Amore, PhD</i>	110
Parete di miocardio ingegnerizzata (TECP) <i>Antonio D'Amore, PhD</i>	112
Valvole cardiache ingegnerizzate (TEHV) <i>Antonio D'Amore, PhD</i>	114
Vasi sanguigni ingegnerizzati (TEVG) <i>Antonio D'Amore, PhD</i>	117

PIATTAFORME TECNOLOGICHE

120

Bioinformatica	122
Bioingegneria	124
Biologia Strutturale e Biofisica	126
Cell Factory	128
Chimica Medicinale	130
High-throughput Screening	132
Imaging Biomedico e Radiomica	134
Informatica Molecolare	136
Ingegneria dei Tessuti	138
Proteomica	140

FINANZIAMENTI PER LA RICERCA

142

Progetti in corso di svolgimento	144
Progetti ammessi a finanziamento	146
Progetti sottomessi	147

PROPRIETÀ INTELLETTUALE E TRASFERIMENTO TECNOLOGICO

148



Networking



4

Accordi in essere per la gestione diretta di laboratori

33

Accordi di collaborazione scientifica e trasferimento tecnologico in essere

7

Accordi di collaborazione scientifica e trasferimento tecnologico stipulati nel 2020

Formazione e occupazione



61 Dipendenti nel 2021

62% 38%



41

Borse di studio

18 University of Pittsburgh

Borse di studio Post Doc presso l'Università di Pittsburgh

36 Borse per Dottorati di Ricerca

Borse per Dottorati di Ricerca

40 Tirocini

Tirocini

Proprietà intellettuale



circa

475

Publicazioni scientifiche

28

Brevetti depositati

Finanziamenti per la ricerca



19.190.031€

Aggiudicati su GRANT nazionali ed internazionali



8.000.000€

Contributo Regionale per il cluster Ri.MED - ISMETT

Diffusione del sapere scientifico



39

Meeting scientifici Ri.MED

10 Eventi interni Ri.MED

35

Partecipazioni ad eventi di settore

9 Eventi istituzionali Ri.MED

Il progetto CBRB



17.070 mq

di laboratori

196.350.000€

il valore dell'investimento



600

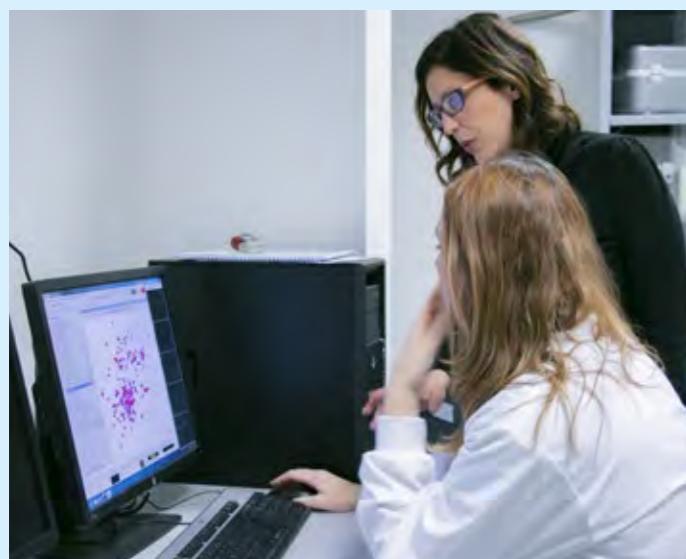
Posti di lavoro previsti

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 40 tirocini, 41 borse di studio, 36 PhD e 18 Post-Doc fellowship: un trend in continuo aumento e destinato a progredire ulteriormente in vista della realizzazione del CBRB.

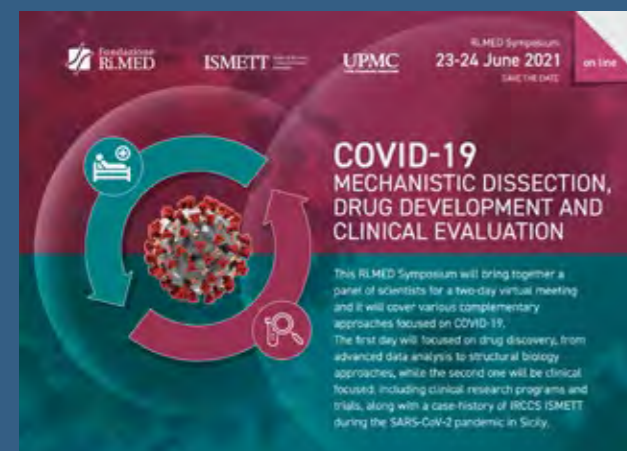
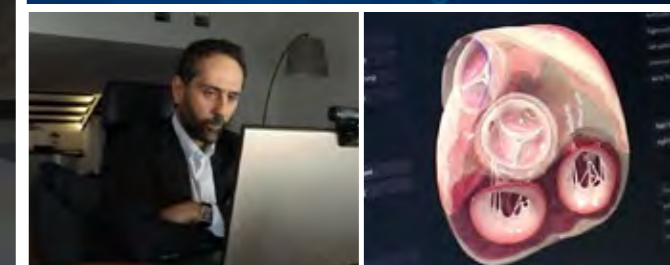


Alcuni di questi programmi sono resi possibili grazie alla partnership con l'Università di Pittsburgh, altri programmi di training sono stati attivati nell'ambito di finanziamenti ottenuti su bandi per la ricerca: nel 2021, 18 vincitori di borse di studio hanno avuto l'opportunità di approfondire le proprie competenze grazie a grant europei (ad esempio i progetti Horizon 2020 "Oactive" e quello ERC consolidator "Biomitral"), ministeriali ("Progema" e "4Frailty") e regionali ("Chemist", "Obind", "Senso", "Prometeo" e iRhom2").

Il 2021 ha visto un considerevole incremento del numero di procedure di selezione, il doppio dell'anno precedente, dato che evidenzia la costante crescita di investimento in risorse umane da parte della Fondazione. Meritano di essere evidenziati in particolare i dati relativi alla Formazione: nel corso del 2021 sono stati attivati 14 tirocini e 18 dottorati di ricerca, oltre una trentina di giovani che stanno sviluppando un bagaglio di competenze che, a sua volta, contribuirà alla crescita e al benessere del territorio.

VALORIZZAZIONE E DIFFUSIONE DEL SAPERE SCIENTIFICO

Le attività legate alla divulgazione scientifica e alla condivisione dei risultati della ricerca fanno parte delle mission proprie della Fondazione. In giugno si è svolto il primo simposio virtuale RiMED: "COVID-19: mechanistic dissection, drug development and clinical evaluation", che ha visto la partecipazione di importanti nomi quali Rolf Hilgenfeld, Camillo Ricordi, Andrea Gambotto, sotto la direzione scientifica di Dario Vignali, Caterina Alfano, Giovanna Frazziano e Monica Miele.



La Fondazione ha inoltre partecipato ad **Innovabiomed**, il *network place* per l'innovazione biomedica, che si è svolto in luglio a Verona e ha visto la partecipazione di oltre 50 aziende ed enti e centinaia di visitatori. Ri.MED era presente con una rappresentanza di ricercatori del gruppo di Bioingegneria e Dispositivi medici (il Group Leader Gaetano Burriesci, con Alessia Viola e Sofia Di Leonardo) del gruppo di Ingegneria dei Tessuti (Arianna Adamo e Marzio Di Giuseppe), e del gruppo di Immunoterapia (Ester Badami) ed è stata premiata come "esempio di convergenza fra salute, scienza e industria". Antonio D'Amore, Ri.MED Group Leader in Ingegneria dei Tessuti, è stato inoltre invitato a presentare la sua innovativa valvola cardiaca al convegno

"Il domani è già realtà. Dalla ricerca di base all'innovazione". D'Amore è stato inoltre protagonista della puntata "Cuore" del programma di informazione e approfondimento scientifico di Rai Cultura in onda su Rai2, Rai3 e Rai Scuola. A ciò si aggiunge la consueta attività seminariale svolta dai ricercatori, che presentano la propria attività scientifica, spesso in qualità di invited speakers, in occasione dei principali meeting scientifici propri della specifica area di interesse. Il 2021 è stato un anno proficuo dal punto di vista delle pubblicazioni scientifiche, oltre una cinquantina 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.



PUBLIC ENGAGEMENT

Coinvolgere ed ispirare un pubblico eterogeneo è una delle nostre priorità, per questo lavoriamo con i principali interlocutori del territorio per coinvolgere cittadini di tutte le età. 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.



INGEGNERIA DEI TESSUTI:
Ricerca, ingegno e tecnologia al servizio della salute

Vi siete mai chiesti di cosa si occupa l'Ingegneria Tissutale?

Secondo voi è possibile ispirarsi alla natura per creare dei "pezzi di ricambio" per il corpo umano?

Il laboratorio di Ingegneria dei Tessuti della Fondazione RI.MED vi condurrà in un mondo affascinante tra i misteri del corpo umano e l'ingegno della tecnologia!

Il team guidato dal Prof. Antonio D'Amore studia e riproduce, tramite tecniche innovative, i tessuti e gli organi dell'uomo.
Il nostro organo preferito? Il cuore!

I nostri ricercatori, progettano, sviluppano e testano organi e dispositivi impiantabili di nuove generazioni. In particolare in campo cardiovascolare. Tramite l'uso di materiali di origine naturale, creano dei sistemi capaci di integrarsi con il corpo del paziente, di rigenerarsi e funzionare come l'organo umano.

Parleremo di scienza e di esperimenti: fino ad arrivare alle più recenti applicazioni in campo biomedico: l'uso di computer per creare modelli di organi e di macchinari per la lavorazione di biomateriali.

Vi mostreremo video, foto ed un dettagliato modellino tridimensionale del cuore! I più piccoli potranno cimentarsi in divertenti simulazioni di strutture ingegnerizzate creando i loro intrecci di "polimeri" e cellule!



Come per tutte le attività di contatto legate agli eventi, il 2021 è stato un anno penalizzato dalle restrizioni legate alla pandemia Covid-19; nonostante ciò, Ri.MED ha potuto prendere parte alla Notte Europea dei Ricercatori con il laboratorio "**Ricerca, ingegno e tecnologia al servizio della salute**" a cura del gruppo di **Ingegneria dei Tessuti**, che ha riscosso grande successo tra grandi e piccini. Sono inoltre proseguite le collaborazioni con le scuole: i laboratori "**Research Friday**" di scienze applicate al liceo STEM del CEI di Palermo e la colla-

borazione con l'Istituto Mursia di Carini e con 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.

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

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, 6 sono stati stipulati nel corso del 2021.

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.

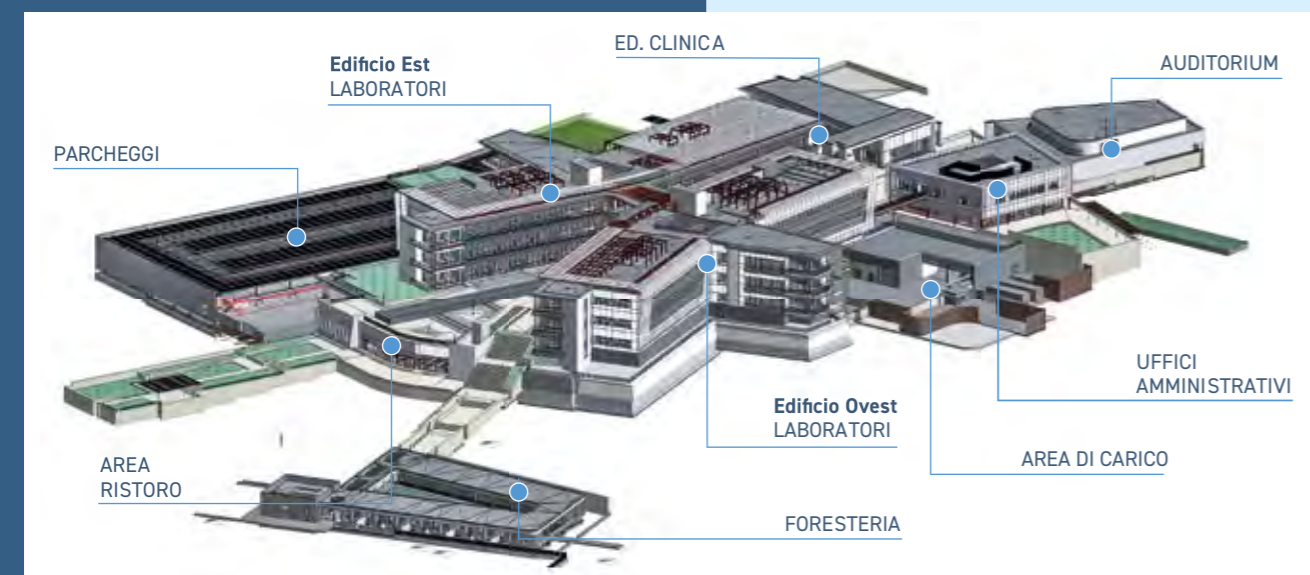


CBRB

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

Ri.MED sta realizzando a Carini, in provincia di Palermo, il Centro per le Biotecnologie e la Ricerca Biomedica (CBRB), un centro 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.

I laboratori e le piattaforme tecnologiche all'avanguardia del CBRB saranno dedicati alla ricerca e sviluppo di vaccini e farmaci innovativi, terapie cellulari ed ingegnerizzazione di organi e tessuti, per diagnosticare precocemente e curare in modo mirato le insufficienze terminali d'organo, i tumori, le malattie infettive e le patologie connesse all'invecchiamento, con particolare attenzione alle malattie neurologiche.



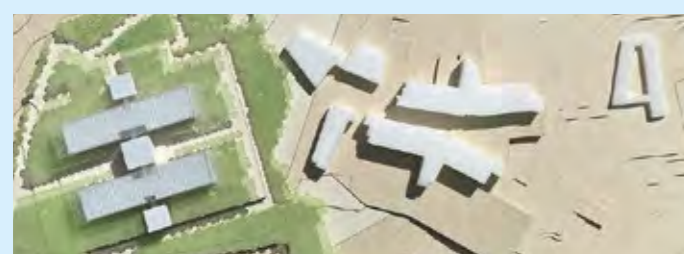
Il cantiere è stato avviato nel 2020 e - nonostante le difficoltà legate all'impatto della pandemia - i lavori di costruzione proseguono con costanza: il cantiere di Carini mostra ormai chiaramente l'assetto del campus di ricerca. L'ATI aggiudicataria della gara per i lavori è capitanata da Italiana Costruzioni S.p.A., mentre la direzione lavori è affidata ad un RTI con capofila Progetto CMR, che afferisce al gruppo già vincitore del concorso di idee per la progettazione del centro guidato da HOK. Nel corso del 2021 sono state ultimate le fondazioni di tutti gli edifici e sono in corso di realizzazione le strutture

in elevazione, di cui alcune giù ultimate, nonché alcune lavorazioni impiantistiche. Il progetto si ispira al modello del 'villaggio-strada' e prevede un'organizzazione dello spazio estremamente flessibile: 17.070 mq di laboratori, ampi spazi comuni, sale riunioni, uffici, un auditorium, la foresteria e il collegamento diretto con il nuovo ospedale ISMETT. Una volta a regime, il centro offrirà occupazione a circa 600 risorse e contribuirà alla generazione di un indotto legato al trasferimento tecnologico dei prodotti della ricerca.

UN CENTRO INTEGRATO DI RICERCA E CURA

Nel 2021 è stato presentato il progetto per la realizzazione del nuovo ospedale ISMETT, progettato da Renzo Piano, che sorgerà proprio accanto al CBRB, nello stesso terreno di Carini: nascerà così in Italia 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.

Le scoperte realizzate al CBRB potranno essere utilizzate dal partner ospedaliero IRCCS-ISMETT e in altri ospedali italiani, migliorando la disponibilità di strumenti diagnostici e terapeutici avanzati e di protocolli per i pazienti.



Si realizza una politica di sviluppo economico fondata sulle scienze biomediche, che nei prossimi anni porterà la Sicilia ad affermarsi anche a livello internazionale quale Polo di eccellenza nel settore Life Sciences, anche grazie al *know how* fornito da UPMC e dall'Università di Pittsburgh.

Lo stato di avanzamento dei lavori di costruzione del CBRB, il progetto del nuovo ISMETT e il conseguente piano strategico per la nascita in Sicilia del centro integrato di ricerca e di cure di alta specializzazione, sono stati presentati nel mese di ottobre al Senato,

alla presenza del Presidente della Repubblica Sergio Mattarella e del Presidente del Senato Maria Elisabetta Alberti Casellati.

Forte il coinvolgimento del partner americano UPMC, con la presenza di Bruno Gridelli e Leslie Davis, nonché dell'Ambasciatrice d'Italia negli Stati Uniti d'America Mariangela Zappia: trasferimento di *know how*, modello gestionale pubblico-privato e partnership internazionali, sono alla base della realizzazione di un centro integrato con competenze complementari.

Renzo Piano ha illustrato il progetto del nuovo ospedale e Sebastiano Musumeci, Presidente della Regione Siciliana, ha condiviso l'impegno della Regione per la realizzazione di interventi strutturali in grado di fornire una risposta assistenziale di eccellenza e di ridurre la cosiddetta mobilità passiva dei pazienti verso altri servizi sanitari.

Focus di Maria Chiara Carrozza, Presidente del Consiglio Nazionale delle Ricerche, sul networking tra diversi enti e tra ricerca di base e applicata.

THE IMPORTANCE OF BEING A CLUSTER

La sfida nel settore del Life Science si gioca sempre più sulla capacità di tradurre velocemente i risultati della ricerca scientifica in applicazioni cliniche, ed è quindi sempre più incentrata sull'integrazione complementare di risorse e competenze di diverse matrici, quali la ricerca di base, la ricerca e lo sviluppo preclinico di nuove terapie, ma anche medical device, biomarcatori e sperimentazione clinica. Il progetto di creazione a Carini di un centro integrato per la ricerca traslazionale e le cure ad alta specializzazione sancirà il pieno compimento della collaborazione strategica tra UPMC, ISMETT e Ri.MED, una partnership internazionale che diventa più concreta di anno in anno.



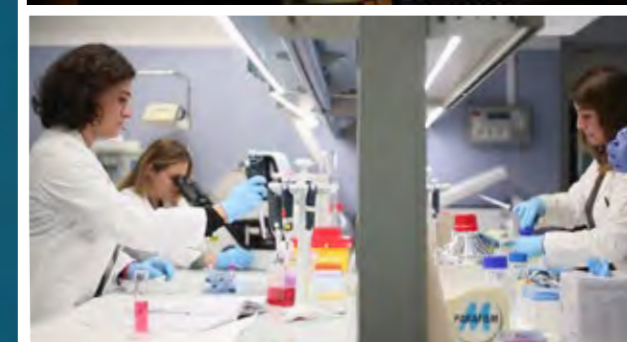
UPMC LIFE CHANGING MEDICINE

ISMETT Istituto di Ricovero e Cura a Carattere Scientifico

Fondazione Ri.MED

Newsletter

UNA SINERGIA SEMPRE PIU' OPERATIVA



Integrare competenze complementari aumenta le potenzialità di successo dei progetti di ricerca traslazionale e, di conseguenza, il successo nel competere al finanziamento delle linee di ricerca. Per questo, visto anche il numero sempre crescente di progetti scientifici congiunti, abbiamo iniziato ad identificare attività di "cluster", caratterizzate dalla comunanza di obiettivi.

Nel corso dell'anno si sono svolte riunioni periodiche di coordinamento, gestito a diversi livelli: il coordinamento di governance, da parte

delle rispettive leadership, fornisce le strategie e gli indirizzi che orientano le attività manageriali; a livello amministrativo, da parte degli uffici grants, per rafforzare sinergicamente l'accesso ai finanziamenti; in ambito scientifico, per aggiornare circa lo stato di avanzamento dei progetti di ricerca congiunti e per identificare nuove opportunità di sviluppo.

Oltre a ciò, gli uffici comunicazione dei tre enti hanno iniziato a collaborare per indirizzare i rispettivi brand verso un'immagine sinergica di cluster.

Ri.MED RESEARCH RETREAT

Dopo due lunghi anni di collegamenti da remoto, nel 2021 i ricercatori della Fondazione hanno potuto ritrovarsi in presenza per un'edizione molto speciale del Ri.MED Research Retreat: un format del tutto nuovo, basato sull'idea di massimizzare la relazione con l'IRCCS ISMETT ed individuare tematiche di ricerca utili ad entrambi. Il Ri.MED Research Retreat è stato infatti focalizzato su specifici *clinical needs* illustrati dai clinici di ISMETT e poi approfonditi nel corso dei tavoli tematici.

A conclusione si è svolta la sessione plenaria del Ri.MED Annual Meeting, con la partecipazione del Presidente Aquilanti e dei responsabili amministrativi, un'occasione per condividere i principali risultati gestionali raggiunti nel 2021 ed i principali obiettivi per il 2022.



La prima parte della giornata è stata dedicata alla presentazione da parte di alcuni medici ISMETT di specifici *clinical needs*, che sono poi stati approfonditi nel corso dei cinque tavoli tematici: **"Mitigare il rischio di infezione nel trapianto di organi solidi"**, **"Guarire il polmone"**, **"Affrontare il danno da ischemia/riperfusionazione di organi solidi tramite farmaci o cellule"**, **"Stato attuale e ruolo futuro della biopsia liquida nella cura del cancro"**, **"Progetti coordinati in neuroscienze"**. I tavoli tematici ISMETT/Ri.MED hanno visto il confronto diretto tra medici e ricercatori, secondo un format che si è rivelato davvero utile per massimizzare la relazione tra

i due enti, ed individuare tematiche di ricerca congiunte. Particolarmente significativo il fatto che siano già in fieri i *follow-up* da parte di alcuni gruppi che grazie al Ri.MED Research Retreat hanno avuto occasione di conoscersi ed interagire.

L'evento si è concluso nel pomeriggio con la **poster session**, un'occasione per tutti i gruppi di ricerca della Fondazione di socializzare i progetti scientifici in corso e per i ricercatori dell'IRCCS ISMETT di presentare i progetti congiunti già avviati con i gruppi Ri.MED di Medicina Rigenerativa e Prodotti cellulari GMP.

GRUPPI DI RICERCA Ri.MED

ATMP - Advanced Therapy Medicinal Products

Regenerative Medicine and Immunotherapy Ri.MED Lab c/o IRCCS ISMETT, Palermo



Giovanna Frazziano, PhD
PROJECT MANAGER
gfrazziano@fondazionerimed.com

- Maria Giovanna Francipane, PhD**
Principal Investigator in Regenerative Medicine
- Cinzia Chinnici, PhD**
Principal Investigator in cellular therapies
- Mariangela Pampalone**
Senior Scientist in Cell Biology
- Simona Corrao, PhD**
Senior Scientist in Cell isolations and transplantation
- Roberto Di Gesù, PhD**
Post Doctoral Researcher
- Mattia Pasqua**
Post Doctoral Researcher
- Ester Badami, PhD**
Principal Investigator in Experimental Immunology
- Daniele Galvagno**
Lab Manager, Senior Specialist in Cell Biology
- Giandomenico Amico, PhD**
Senior Specialist in cytofluorimetry
- Claudia Carcione**
Laboratory Technician
- Giampiero Vitale**
Laboratory Technician
- Salvatrice Lo Giudice**
Laboratory Support

La vera forza dei programmi di sviluppo scientifico della Fondazione Ri.MED sono loro: i nostri ricercatori, di cui oltre il 60% sono donne. Al momento i gruppi sono dislocati presso diverse sedi e sono in continua espansione, anche in vista della prossima apertura del centro di ricerca a Carini, dove confluiranno tutti. Accanto al personale strutturato, nel 2021 si contano 45 figure junior, tra tirocinanti, dottorandi, borsisti e Post-Doc: formazione ed entusiasmo sono alla base della nostra crescita.

TISSUE ENGINEERING AND BIOENGINEERING

Tissue Engineering Ri.MED Lab c/o Università di Palermo



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
- Marzio Di Giuseppe, PhD**
Scientist - Expert in Numerical Methods
- Laura Modica de Mohac, PhD**
Post Doctoral Researcher - Expert in Bioprocessing
- Laubrie Soto Joan Dario, PhD**
Scientist - Expert in Numerical Methods
- Viktor Balashov, PhD**
Post Doctoral Researcher in Tissue Engineered Heart Valves
- Marianna Barbuto**
PhD student in Technologies and Health Sciences
- Pietro Terranova**
PhD Student in Mechanical, Manufacturing, Management and Aerospace Innovation
- Patrizia Caruso**
PhD Student in Chemical, Environmental, Biomedical, Hydraulic and Materials engineering
- Elisa Lanzalaco**
PhD Student in Chemical, Environmental, Biomedical, Hydraulic and Materials engineering
- Fatemeh Salahi**
PhD Student in Mechanical, Manufacturing, Management and Aerospace Innovation

Bioengineering Ri.MED Lab c/o Università di Palermo



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

- Danila Vella, PhD**
Post Doctoral Researcher in Computational Bioengineering
- Alessandra Monteleone, PhD**
Post Doctoral Researcher in Computational Bioengineering
- Sofia Di Leonardo**
PhD student in Engineering of Technological Innovation
- Giulio Musotto**
PhD student in Engineering of Technological Innovation
- Alessia Viola**
PhD student in Civil, environmental and materials engineering

GMP CELL FACTORY & PRECLINICAL RESEARCH

GMP Cell Factory Ri.MED Lab c/o IRCCS ISMETT, Palermo



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

- Daniilo D'Apolito, PhD**
Quality Control Manager and Senior Scientist in Gene therapies
- Monica Miele, PhD**
GMP Production Manager and Senior Scientist in Immunology
- Francesca Timoneri, PhD**
Senior Specialist in Cell Production
- Mariangela Di Bella**
Senior Specialist in Cell Production
- Salvatore Pasqua**
Laboratory Technician

Preclinical Research Ri.MED Lab c/o Istituto Zooprofilattico, Palermo



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

- Nazareno Costa**
Animal Care



DRUG DISCOVERY

Molecular Informatics

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



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

Maria Rita Gulotta, PhD
Specialist in compound Management
Davide Sardina, PhD
Post Doctoral Researcher in Bio e Molecular informatics
Giada De Simone
Scientist in Molecular Informatics
Nedra Mekni
Scientist in Computational Chemistry
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
Federica Bucolo
PhD Student in Applied Biology and Experimental Medicine

Advanced Data Analysis

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



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

Albert Comelli, PhD
Senior Scientist in Biomedical Image
Walter Arancio, PhD
Post Doctoral Researcher in Bioinformatics
Anna Maria Pavone
PhD Student in Biomedical and preclinical biotechnologies
Riccardo Laudicella
PhD Student in Biomedical Engineering
Viviana Benfante
PhD Student in Molecular and Clinical Medicine
Simone Valenti
PhD Student in Information and Communication Technologies
Vincenzo Martorana
PhD Student in Economics and Statistics
Stefano Puccio
PhD Student in Biodiversity in Agriculture and Forestry

Structural Biology and Biophysics

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



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

Maria Agnese Morando, PhD
Senior specialist Protein MNR
Raffaele Sabbatella
Structural Biology Laboratory Technician
Elisa Monaca
Structural Biology Laboratory Technician
Martina Sollazzo
PhD student in Technologies and Health Sciences
Vito D'Alessandro
PhD student in Nanotechnologies
Francesca Venturella
Trainee

Proteomics

Ri.MED Lab c/o IRCCS ISMETT, Palermo



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

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

Medicinal Chemistry

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



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

Simona Di Martino, PhD
Senior Scientist in Medicinal Chemistry
Giovanna Li Petri, PhD
Post Doctoral Researcher in Medicinal Chemistry

Identification of Therapeutic Targets and Screening

Ri.MED Lab c/o IRIB CNR, Palermo



Chiara Cipollina, PhD
GROUP LEADER IN EXPERIMENTAL LUNG
RESEARCH
ccipollina@fondazionerimed.com

Marco Buscetta, PhD
Scientist in Experimental Lung Research
Marta Cristaldi, PhD
Laboratory Technician
Maura Cimino, PhD
Post Doctoral Researcher in Imaging
Maria Rita Giuffrè
Specialist in Cell Biology and Biochemistry
Paola Dino
PhD Student in Biomedicine and neuroscience
Agnese La Mensa
PhD Student in Biomedicine, Neuroscience and Advanced Diagnostics
Nadia Moukri
PhD Student in Chemical, Environmental, Biomedical, Hydraulic and Materials Engineering,



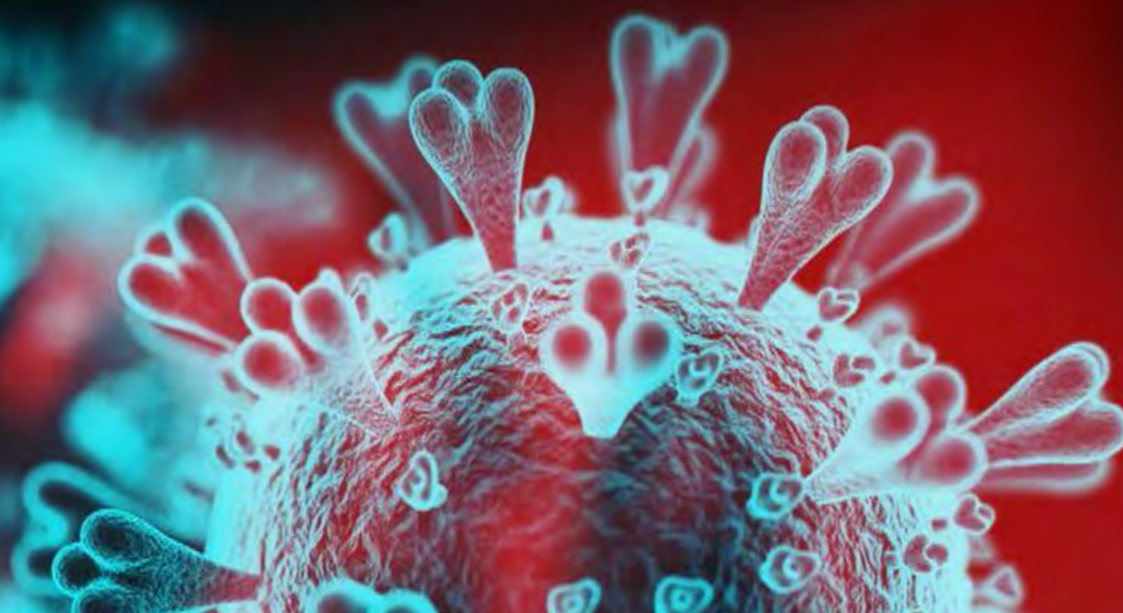
Ri.MED SUPPORTED SCIENTIST



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



Lo stato di emergenza legato alla pandemia di Covid-19 si è protratto per tutto il 2021. Parallelamente ai programmi di ricerca e sviluppo propri della Fondazione, i nostri scienziati, desiderosi di offrire il proprio contributo, hanno portato avanti progetti scientifici e collaborazioni focalizzati sul Covid-19 già avviati l'anno precedente, quali ad esempio la caratterizzazione strutturale di proteine del SARS-CoV-2, la selezione di molecole lead per i bersagli SPIKE e Mpro e la selezione di microRNAs espressi nei tessuti polmonari.

La Fondazione ha organizzato in giugno un proprio simposio virtuale incentrato su questo tema: "COVID-19: mechanistic dissection, drug development and clinical evaluation". Il meeting ha visto la partecipazione di importanti nomi, quali **Rolf Hilgenfeld**, **Camillo Ricordi** e **Andrea Gambotto**, insieme ai ricercatori della Ri.MED **Ugo Perricone**, **Caterina Alfano**, **Albert Comelli** e **Monica Miele**.

Particolarmente rilevanti sono state le collaborazioni, in primis quelle scaturite in seno al cluster Ri.MED - ISMETT - UPMC a cavallo tra Italia e USA, ma anche quelle a livello europeo, in particolare l'adesione al Consorzio Internazionale Covid-19 NMR.

L'approccio basato sulla Drug Discovery, presentato nel corso della prima giornata, era finalizzato alla scoperta di nuove e più efficaci terapie. Il Prof. Rolf Hilgenfeld, biologo strutturale che dai primi anni 2000 studia le proteine di coronavirus, ha presentato il suo lavoro volto allo sviluppo di molecole in grado di inibire l'azione della Main Proteasi, di cui per primo ha fornito la struttura tridimensionale. La Dott.ssa Caterina Alfano, Group Leader di Biologia Strutturale e Biofisica per la Fondazione Ri.MED ha condotto diversi studi mirati ad ottenere un quadro completo dei meccanismi di SARS-CoV-2, sia per identificare altri bersagli proteici SARS-CoV-2 diversi dalla proteina Spike, sia per capire quali proteine delle cellule ospiti sono essenziali per la replicazione del virus. In collaborazione con la Fondazione EBRI Rita Levi Montalcini, il gruppo della Dr. Alfano sta sviluppando anticorpi neutralizzanti per le proteine nsp-9 ed N di SARS-CoV-2, ed è impegnato nello studio delle interazioni tra

il complesso di trascrizione dell'RNA virale e un'importante classe di proteine umane, le La-related-proteins (LaRPs).

La seconda giornata di lavori è stata focalizzata invece sulla ricerca clinica e sulle esperienze con i pazienti ospedalizzati. Il Prof. Gambotto dell'Università di Pittsburgh ha presentato i risultati dei trial clinici condotti in USA sul vaccino da lui sviluppato; sempre da Pittsburgh arriva lo studio del Dr. Cillo, relativo ai modelli predittivi generati dai profili trascrizionali registrati al primo giorno di ricovero in terapia intensiva; il Prof. Ricordi - già Presidente della Fondazione Ri.MED per il precedente quinquennio - ha presentato i dati relativi agli studi condotti a Miami in collaborazione con il Dr. Lanzoni sulla somministrazione di cellule staminali da placenta per il trattamento dei pazienti con stress respiratorio acuto. Un apporto fondamentale è venuto dal partner clinico della Fondazione Ri.MED: l'IRCCS ISMETT di Palermo infatti ha attivato la terapia intensiva di terzo livello per la gestione della pandemia. La Dott.ssa Panariello, a capo dell'Unità di terapia intensiva, ha portato la propria testimonianza sull'utilizzo dell'ossigenazione veno-venosa extracorporea a membrana (V-V ECMO) come terapia salvavita nel trattamento dei pazienti ricoverati; la Dr. Monica Miele, capo produzione GMP della Fondazione Ri.MED, ha collaborato inoltre con il Dott. Bulati allo studio di efficacia del vaccino Pfizer su pazienti ISMETT trapiantati ed - in generale - immunodepressi.



INFORMATICA MOLECOLARE E CHIMICA MEDICINALE

Mpro

Team Ri.MED: Gruppo di Informatica Molecolare e Gruppo di Chimica Medicinale

ABSTRACT

Lo studio riguarda una fase tardiva del ciclo virale, che coinvolge la 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 hanno sviluppato, in collaborazione con il gruppo di Advanced Data Analysis un modello di classificazione basato su approcci classici di machine learning con l'obiettivo di ottimizzare la prioritizzazione computazionale di molecole predette come attive sul target Mpro. Tale modello infatti risulta un utile supporto alle funzioni di scoring impiegate in altre tecniche classiche di virtual screening.

RISULTATI

Release del modello di machine learning e selezione di 100 composti da testare su Mpro.

PUBBLICAZIONI

Nedra Mekni, **Claudia Coronello**, **Thierry Langer**, **Maria De Rosa**, **Ugo Perricone**, Support Vector Machine as a Supervised Learning for the Prioritization of Novel Potential SARS-CoV-2 Main Protease Inhibitors, *Int. J. Mol. Sci.* 2021, 22(14), 7714

IMMUNOLOGY AND TRANSPLANTS

Specific Anti-SARS-CoV-2 Cellular Immune Responses study after BNT162b2 Pfizer-BioNTech mRNA-based vaccine in a solid organ transplant recipient cohort

Team Ri.MED: Gruppo di GMP Cell Factory e Medicina Rigenerativa
PARTNERSHIP: IRCCS ISMETT

ABSTRACT

La vaccinazione anti SARS-CoV-2 è considerata la migliore strategia sanitaria in grado di porre fine alla pandemia di COVID-19. L'infezione virale sembra avere un impatto negativo sui trapiantati di organi solidi (SOTR) rispetto alla popolazione generale, ma l'effetto della vaccinazione in questo sottogruppo di pazienti fragili non è noto a causa dell'esclusione dei SOTR dagli studi di vaccinazione. Per caratterizzare al meglio l'efficacia della vaccinazione sulla risposta immunitaria nei SOTR, abbiamo valutato le risposte delle cellule B e T in 80 SOTR e in 42 soggetti immunocompetenti (IC), dopo la conclusione del primo ciclo vaccinale e dopo la dose di richiamo (booster). I campioni di sangue degli IC e dei SOTR sono stati prelevati a *time points* definiti. E' stata studiata la concentrazione sierica di IgG anti-proteina Spike tramite un test di chemiluminescenza, mentre per valutare il numero di cellule T SARS-CoV2 specifiche presenti nelle cellule mononucleate del sangue periferico (PBMC) è stato utilizzato il test *ex vivo* IFN- γ -ELISpot.

RISULTATI

I nostri risultati suggeriscono che l'attuale approccio vaccinale con Pfizer-BioNTech contro il SARS-CoV-2 potrebbe essere meno efficace rispetto quanto atteso nei paziente fragili come i SOTR. Questi risultati, se convalidati in studi più ampi, confermeranno la necessità di nuovi approcci volti a ottenere una migliore stimolazione dell'immunogenicità specifica attraverso l'uso di vaccini a più alto dosaggio, ripetuti richiami o uso di specifici adiuvanti. In questo scenario, è chiaro che gli studi clinici che utilizzano endpoint clinici specifici, per definire l'efficacia del vaccino SARS-CoV-2 in SOTRs diventa un'esigenza urgente.

PUBBLICAZIONI

- "Impaired anti-SARS-CoV-2 humoral and cellular immune response induced by Pfizer-BioNTech BNT162b2 mRNA vaccine in solid organ transplanted patients". **Monica Miele**, Rosalia Busà, Giovanna Russelli, Maria Concetta Sorrentino, **Mariangela Di Bella**, **Francesca Timoneri**, Alessandra Mularoni, Giovanna Panarello, Patrizio Vitulo, Pier Giulio Conaldi, Matteo Bulati. *Am J Transplant.* 2021;21:2919-2921.

- "Specific Anti-SARS-CoV-2 Humoral and Cellular Immune Responses after Booster Dose of BNT162b2 Pfizer-BioNTech mRNA-based Vaccine. Integrated Study of Adaptive Immune System Components". Busà R, Sorrentino MC, Russelli G, **Amico G**, Miceli, **Miele M**, **Di Bella M**, **Timoneri F**, Gallo A, Zito G, Di Carlo D, Conaldi PG, Bulati M. *Frontiers in Immunology* (in press)

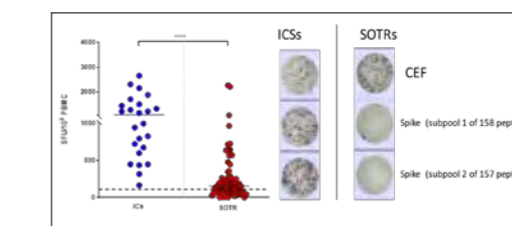


Fig 1. Il dot plot descrive la frequenza di IFN- γ -cellule circolanti stimolate con pool di peptidi della proteina Spike del SARS-CoV-2 e CEF (pool di peptidi come controllo positivo) dopo la conclusione del I ciclo di vaccinazione nella coorte di SOTRs and ICs studiata



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
- European Synchrotron Radiation Facility (ESRF), Grenoble, France
- 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 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. La proteina N, anch'essa dimerica, racchiude il filamento positivo dell'RNA virale e svolge un ruolo importante nel migliorare l'efficienza della trascrizione dell'RNA virale sottogenomico. 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, N full length, N-CTD, e orf8. Abbiamo inoltre messo a punto i protocolli 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 nsp9. 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.

In collaborazione con la Fondazione EBRI Rita Levi Montalcini, stiamo inoltre lavorando all'identificazione e caratterizzazione biofisica di scFvs contro proteine di SARS-CoV-2.

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*, 8:89. doi: 10.3389/fmolb.2021.653148.
- 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*, 5(2):235-241. doi: 10.1007/s12104-021-10011-0.

Ri.MED nel Consorzio Internazionale Covid-19 - NMR

TEAM Ri.MED: Gruppo di Biologia Strutturale e Biofisica

PARTNERSHIP

- Goethe University of Frankfurt
- 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. Gli studi attualmente in corso sono mirati alla caratterizzazione dei processi di oligomerizzazione che coinvolgono la proteina orf8.

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*, 8:89. doi: 10.3389/fmolb.2021.653148.
- 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*, 5(2):235-241. doi: 10.1007/s12104-021-10011-0.

IMAGING E RADIOMICA, ADVANCED DATA ANALYSIS E IDENTIFICAZIONE DI TARGET TERAPEUTICI

Customized Efficient Neural Network per l'identificazione della regione infetta da COVID-19 nelle immagini CT

TEAM Ri.MED: Gruppo di Imaging e Radiomica e Advanced Data Analysis

PARTNERSHIP

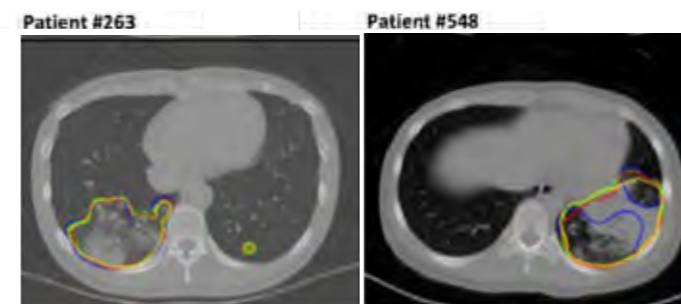
Istituto di Bioimmagini e Fisiologia Molecolare (IBFM-CNR), Cefalù (PA), Italia.

ABSTRACT

Nel campo dell'imaging biomedico presentiamo un approccio di deep learning personalizzato volto ad affrontare l'identificazione e la segmentazione in tempo reale e completamente automatizzate delle regioni infette da COVID-19 nelle immagini di tomografia computerizzata. In uno studio precedente, abbiamo adottato ENET, originariamente utilizzato per compiti di segmentazione dell'immagine in auto a guida autonoma, per la segmentazione dell'intero parenchima in pazienti con fibrosi polmonare idiopatica che ha diverse somiglianze con la malattia COVID-19. Per identificare e segmentare automaticamente le aree infette da COVID-19, è stato implementato un ENET personalizzato, ovvero C-ENET, e le sue prestazioni rispetto all'ENET originale e ad alcune architetture di deep learning all'avanguardia. I risultati sperimentali dimostrano l'efficacia del nostro approccio. Considerando le prestazioni ottenute in termini di coefficiente di similarità del risultato della segmentazione al gold standard (DSC ~75%), la nostra metodologia proposta può essere utilizzata per l'identificazione e la delimitazione delle aree infette da COVID-19 senza alcuna supervisione di un radiologo, al fine di ottenere un volume di interesse indipendente dall'utente.

RISULTATI

Abbiamo dimostrato che il modello di deep learning personalizzato proposto può essere applicato per identificare rapidamente e segmentare le regioni infette da COVID-19 per estrarre successivamente informazioni utili per valutare la gravità della malattia attraverso analisi radiomiche.



Immagini CT che mostrano il parenchima con sottoregioni visibili (giallo per il gold standard, rosso per C-ENET, verde per ENET e blu per ERFNet) infettate dalla malattia COVID-19.

Mask-integrated sensor for oxidative stress (Sensomar)

TEAM Ri.MED: Gruppo di Experimental Lung Research

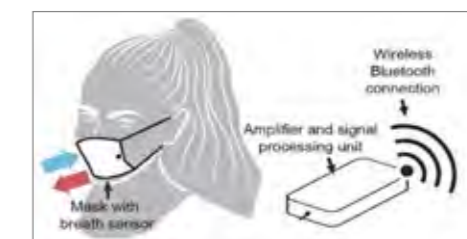
PARTNERSHIP

- Università degli Studi di Palermo
- Istituto per la Ricerca e l'Innovazione Biomedica (IRIB-CNR)
- Istituto di Fisiologia Clinica (IFC-CNR)

FINANZIAMENTI: FISR 2020

ABSTRACT

Le forme più gravi di Covid-19 presentano un quadro fisiopatologico analogo a quello riscontrato in altre forme di distress respiratorio caratterizzate da un aumento di marcatori di stress ossidativo (SO). Evidenze cliniche e sperimentali riconoscono nell'incremento dello SO un ruolo patogenetico determinante e precoce del danno polmonare. Pertanto, la valutazione di mediatori di SO nei fluidi biologici fornisce informazioni utili a discriminare i profili infiammatori, predire riacutizzazioni, identificare i quadri patologici più severi, e monitorare il fenomeno epidemico. L'obiettivo del progetto è lo sviluppo di un dispositivo innovativo, economico e miniaturizzato per il monitoraggio dei pazienti affetti da patologie respiratorie, attraverso la rilevazione non invasiva del perossido di idrogeno (marker di SO) nell'esalato respiratorio. Tale dispositivo, integrato in una mascherina, si interfaccerà con un sistema remoto e fornirà informazioni sull'evolversi della malattia ai soggetti coinvolti nella filiera sanitaria (paziente, medico, istituzioni, etc.). Il dispositivo avrà ricadute applicative dirette per i pazienti affetti da COVID-19, sia in uno scenario di monitoraggio domiciliare sia nei pazienti ospedalizzati in aggiunta ai tradizionali sistemi di monitoraggio per identificare precocemente i quadri in rapida evoluzione e monitorare la risposta ai trattamenti.



RISULTATI

1. Realizzazione di un sensore nano-strutturato integrato in mascherina per la misurazione dello SO e di un dispositivo centralizzato di monitoraggio;
2. Sviluppo di un sistema di produzione circolare in grado di produrre i volumi richiesti;
3. Sviluppo di un sistema di supporto alla decisione a scopo diagnostico/terapeutico/epidemiologico.

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 nel 2021 si è arricchita con 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 sottomettere 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.

Sviluppo di anticorpi neutralizzanti contro SARS-CoV-2

Caterina Alfano, PhD

Identificazione e caratterizzazione delle interazioni tra SARS-CoV-2 e proteine LaRP

Caterina Alfano, PhD

Meccanismi molecolari delle malattie da misfolding proteico

Caterina Alfano, PhD

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

Caterina Alfano, PhD

Il ruolo delle sequenze ripetute nella senescenza cellulare e nell'invecchiamento

Walter Arancio, PhD

Ruolo degli inflammasomi nell'infiammazione polmonare associata al fumo di sigaretta

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 e sintesi di nuovi potenziali inibitori di KDM4a

Maria De Rosa, PhD

Progettazione e sintesi di nuovi potenziali inibitori dell'Inflammasoma NLRP3

Maria De Rosa, 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

iRhom2: un nuovo target terapeutico in osteoartrosi?

Simone Dario Scilabra, PhD

iRhom2 regola il rilascio delle molecole MHC di classe I

Simone Dario Scilabra, PhD

Ruolo di iRhom2 nella regolazione dei livelli delle molecole del complesso maggiore di istocompatibilità di classe I e nella risposta dell'adenocarcinoma pancreatico all'immunoterapia

Simone Dario Scilabra, PhD

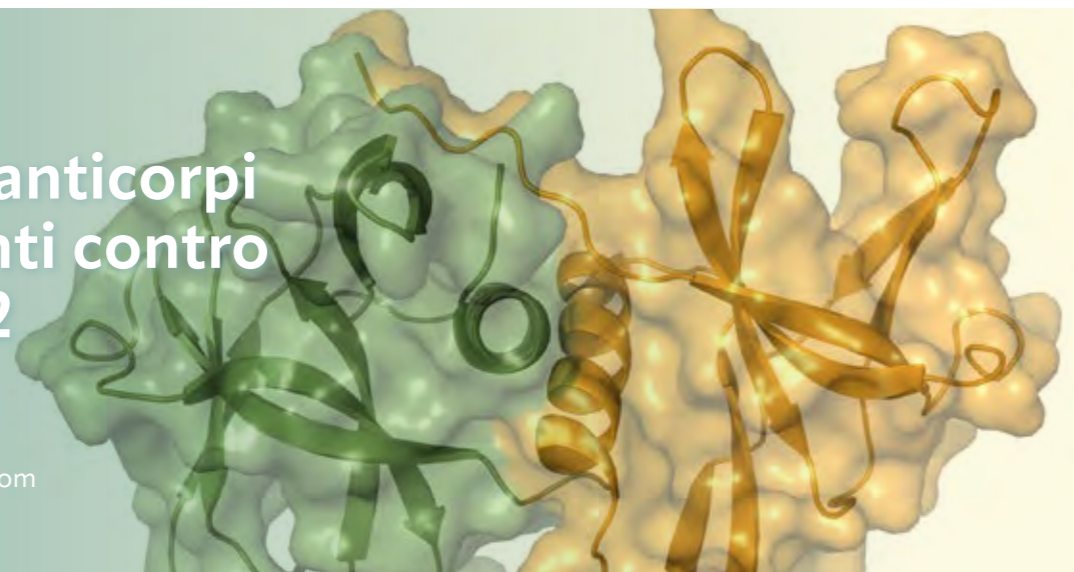
OBIND – Oncological therapies through Biological Interaction Network Discovery

Claudia Coronello, PhD Ugo Perricone, PhD

PRODOTTI: **Farmaci biologici**

Sviluppo di anticorpi neutralizzanti contro SARS-CoV-2

Caterina Alfano, PhD
calfano@fondazionerimed.com



COLLABORAZIONI

- European Brain Research Institute Rita Levi Montalcini (EBRI) – Roma, Italia
- Scuola Normale Superiore (SNS) - Pisa, Italia

AREA TERAPEUTICA

Malattie infettive



BREVE DESCRIZIONE

La pandemia da COVID-19 che si è diffusa nell'ultimo biennio è ancora in corso, nonostante siano state sviluppate diverse strategie mirate a prevenirne l'infezione o alleviarne le manifestazioni cliniche. La maggior parte degli sforzi è stata investita nello sviluppo di vaccini, in grado di indurre una risposta immunitaria contro la proteina virale Spike, e di anticorpi neutralizzanti contro Spike. Tuttavia, considerando la natura mutante di SARS-CoV-2 che riguarda principalmente la regione Spike, l'efficacia dei tool ad oggi disponibili non è dimostrata per le attuali e future varianti del virus. Obiettivo del nostro progetto di ricerca è trovare trattamenti più durevoli e ad ampio spettro che siano efficaci contro le numerose varianti del virus e che possano contrastare anche future pande-

mie da coronavirus. In particolare, siamo coinvolti nello sviluppo di anticorpi, in formato di *single chain fragment variable (scFv)*, contro la proteina del Nucleocapside (N) e la proteina Nsp9 di SARS-CoV-2, piuttosto che sulla sola proteina Spike, la cui rapida ed elevata mutabilità si traduce in una riduzione dell'efficacia dei trattamenti disponibili. Entrambe le proteine scelte sono di estrema rilevanza biologica e terapeutica. Nsp9 è una proteina dimerica legante ssRNA altamente conservata tra i Betacoronavirus ed è coinvolta nella replicazione e trascrizione del virus. La proteina N, anch'essa dimerica, racchiude il filamento positivo dell'RNA virale e svolge un ruolo importante nel migliorare l'efficienza della trascrizione dell'RNA virale sottogenomico.

IMPATTO

Dall'inizio della pandemia da COVID-19, la maggior parte degli sforzi è stata investita nello sviluppo di vaccini in grado di indurre una risposta immunitaria contro la proteina virale Spike, e di anticorpi neutralizzanti contro Spike. Tuttavia, uno degli interrogativi a cui la ricerca ha provato sin da subito a dare una risposta riguarda l'estrema variabilità del virus SARS-CoV-2, prevalentemente dovuta alla natura altamente mutante della proteina Spike, che rende sempre meno efficaci i tool terapeutici ad oggi sviluppati. 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 da coronavirus. I dati fin qui prodotti su Nsp9 e la proteina N forniscono il prerequisito per selezionare e sviluppare nuovi anticorpi neutralizzanti contro queste due proteine, prevenendo così la replicazione virale e/o attenuando l'aggressività del virus.

RISULTATI RAGGIUNTI NEL 2021

È stato effettuato il clonaggio e la messa a punto dell'espressione e purificazione della proteina N del nucleocapside, sia nella forma *full-length* che il solo dominio C-terminale (CTD) implicato nella dimerizzazione della proteina. Su entrambi i costrutti è stata effettuata la caratterizzazione biofisica mediante dicroismo circolare e risonanza magnetica nucleare, che ha permesso di verificare il corretto *folding* delle proteine prodotte e valutarne la loro stabilità. La produzione e caratterizzazione della N ricombinante è stato il prerequisito per lo screening di frammenti biologicamente attivi ed in particolare di anticorpi in formato *scFv*, selezionati dai nostri collaboratori dell'EBRI e della SNS attraverso la tecnica IACT (*Intracellular Antibody Capture Technology*). Sono stati quindi effettuati gli studi di interazione, mediante tecnologia *Bio-Layer Interferometry (BLI)*, tra cinque anticorpi selezionati e la proteina N. I risultati preliminari mostrano affinità nell'ordine nM per almeno due *scFv* selezionati, prevedendo un percorso promettente nello sviluppo di anticorpi contro SARS-CoV-2.

OBIETTIVI PER IL 2022

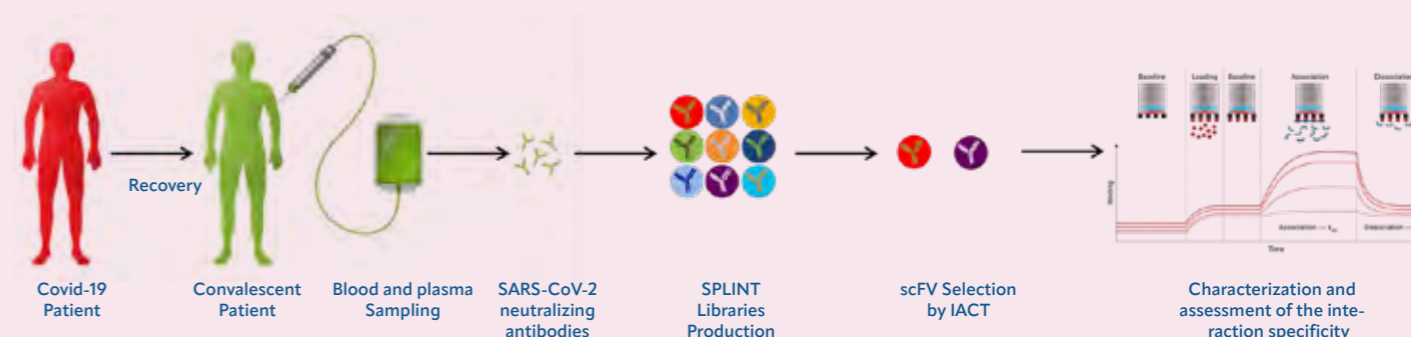
Verranno prodotte quantità nell'ordine delle decine di mg della proteina N, sia non marcata per test di cristallizzazione, che doppiamente marcata ¹⁵N/¹³C per la determinazione mediante *NMR Chemical Perturbation Analysis* delle superfici coinvolte nell'interazione con le *scFv*. I campioni marcati verranno 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 verrà eseguita automaticamente, utilizzando software dedicati basati su *Artificial Intelligence*, e convalidata manualmente. Questo permetterà di raggiungere velocemente i nostri obiettivi e aprirà la possibilità a studi strutturali dei complessi N/*scFv*. I *scFv* selezionati saranno prodotti da EBRI in quantità e purezza tali da consentire di effettuare gli studi strutturali e di interazione necessari. Parallelamente sarà effettuata la selezione di anticorpi contro la proteina Nsp9, a cui seguirà la determinazione dei parametri cinetici di interazione mediante BLI.

CONFERENZE

- *Exploring the druggability of SARS-CoV-2-COVID-19 NMR Webinar*, June, 2021, online;
- *Structural biology for medicine and biotechnology*, December, 2021, online;
- *COVID-19: mechanistic dissection, drug development and clinical evaluation*. Ri.MED virtual symposium, June, 2021, online.

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*, 8:89. doi: 10.3389/fmolb.2021.653148.
- 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*, 5(2):235-241. doi: 10.1007/s12104-021-10011-0.



Rappresentazione schematica del nostro flusso di lavoro. Dai sieri di pazienti convalescenti a scFvs ricombinanti. Immagine adattata da Casadeval & Pirofski (2020) *J. Clin. Invest.*, 130(4): 1545.

Identificazione e caratterizzazione delle interazioni tra SARS-CoV-2 e proteine LaRP

Caterina Alfano, PhD
calfano@fondazionerimed.com



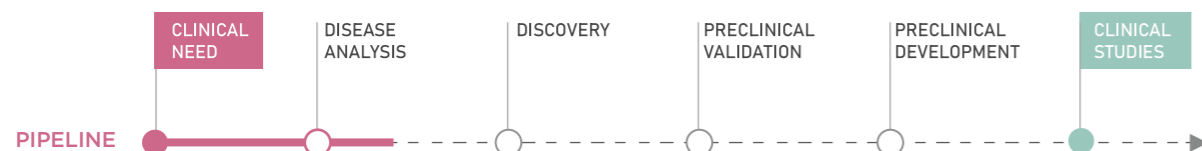
COLLABORAZIONI

- Randall Division of Cell and Molecular Biophysics, King's College London (KCL), Regno Unito
- Institute of Biochemistry I, University of Regensburg, Germania



AREA TERAPEUTICA

Malattie infettive



BREVE DESCRIZIONE

SARS-CoV-2, così come tutti i virus, infetta la cellula ospite per poter completare il proprio ciclo vitale sequestrando e dirottando le proteine eucariotiche a suo favore mediante contatti RNA-proteina o proteina-proteina (PPIs). Queste interazioni sono di fondamentale importanza per l'assemblaggio del Complesso di Replicazione e Trascrizione (RTC) di SARS-CoV-2, la cui unità funzionale è costituita da tre proteine non strutturali: nsp12 (o RNA polimerasi RNA-dipendente) responsabile della polimerizzazione nucleotidica, e dalle proteine nsp7 e nsp8 che agiscono rispettivamente da cofattore e primasi. Nuove evidenze basate su studi di proteomica e computazionali suggeriscono che

alcune *La Related Proteins* (LaRPs) rivestirebbero un ruolo cruciale nella replicazione del genoma virale. I cinque membri della superfamiglia LaRPs (Genuine La, LaRP1, LaRP4A, LaRP4B e LaRP7), sebbene accomunati dal motivo N-terminale estremamente conservato (La Module, LaM), riconoscono substrati diversi e, conseguentemente, sono coinvolti in processi diversi di regolazione degli RNA cellulari. Il nostro obiettivo è quello di identificare e caratterizzare dal punto di vista strutturale le interazioni che coinvolgono il cuore del Complesso RTC di SARS-CoV-2 (nsp12-8-7) e le proteine LaRPs al fine fornire informazioni utili per lo sviluppo di molecole in grado di bloccare la replicazione del virus.

IMPATTO

La comprensione delle modalità con cui i virus sequestrano e sfruttano i sistemi dell'ospite per assolvere il proprio ciclo di infezione è di cruciale importanza per sviluppare strategie efficaci che mirino all'eliminazione dell'agente eziologico. In questo contesto, la profonda conoscenza del ruolo che le LaRPs hanno nella replicazione di SARS-CoV-2 contribuirà alla lotta contro la pandemia da SARS-CoV-2 ed eventuali future epidemie e/o pandemie da coronavirus. In particolare, la caratterizzazione biofisica e strutturale delle superfici di interazione tra una LaRP e l'RTC di SARS-CoV-2 saranno utili per lo sviluppo di inibitori capaci di revertire il sequestro di LaRPs ad opera di SARS-CoV-2 e inibire, di conseguenza, la replicazione virale.

RISULTATI RAGGIUNTI NEL 2021

Nel 2021 abbiamo ottimizzato i protocolli di produzione per LaRP ricombinanti (sia *full length* che LaM), e i membri del mini-RTC di SARS-CoV-2 (nsp12-nsp8-nsp7). Alcune LaRP ed nsp12 hanno dimensioni considerevoli per l'espressione nei sistemi batterici, quindi abbiamo applicato diverse strategie di clonaggio molecolare per ottenere la massima resa da cellule di *E.coli*. Abbiamo anche messo a punto pro-

cedure di purificazione *ad hoc* che hanno permesso di ottenere milligrammi di proteine ad alta purezza adatte per studi biofisici. Abbiamo quindi eseguito esperimenti preliminari di interazione con la tecnica dell'interferometria BioLayer (BLI). Le analisi di legame hanno mostrato affinità di LaRP7 per nsp8, in accordo con i dati proteomici pubblicati. Gli studi biofisici che coinvolgono LaRP4 sono ora in corso per valutare se anch'essa interagisce con l'RTC.

OBIETTIVI PER IL 2022

Per il 2022 l'obiettivo sarà quello di confermare le interazioni osservate negli studi preliminari ed approfondire l'analisi per gli altri membri della famiglia delle LaRP (LaRP4A, LaRP4B e Genuine La). Saranno testate le affinità verso il mini-RTC di SARS-CoV-2 mediante tecniche di biofisica come BLI e Calorimetria Isotermica di Titolazione (ITC). Le interazioni che daranno esito positivo *in vitro*, saranno quindi studiate in cellula usando cellule umane con *knock-out* o *knock-down* per le proteine LaRPs. Le cellule verranno infettate con virioni di SARS-CoV-2 presso il gruppo della Prof.ssa Conte del *Randall Division for Cell & Molecular Biophysics del King's College of London (UK)*, e verrà valutata la capacità di replicazione virale in assenza di LaRP.



CONFERENZE

- AIC School 2021 - Fundamentals of Crystallography: the theory behind the crystal structure solution. August, 2021, online;
- Exploring the druggability of SARS-CoV-2-COVID-19 NMR Webinar, June, 2021, online;
- COVID-19: mechanistic dissection, drug development and clinical evaluation. Ri.MED virtual symposium, June, 2021, online.



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*, 8:89. doi: 10.3389/fmolb.2021.653148.
- 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*, 5(2):235-241. doi: 10.1007/s12104-021-10011-0.

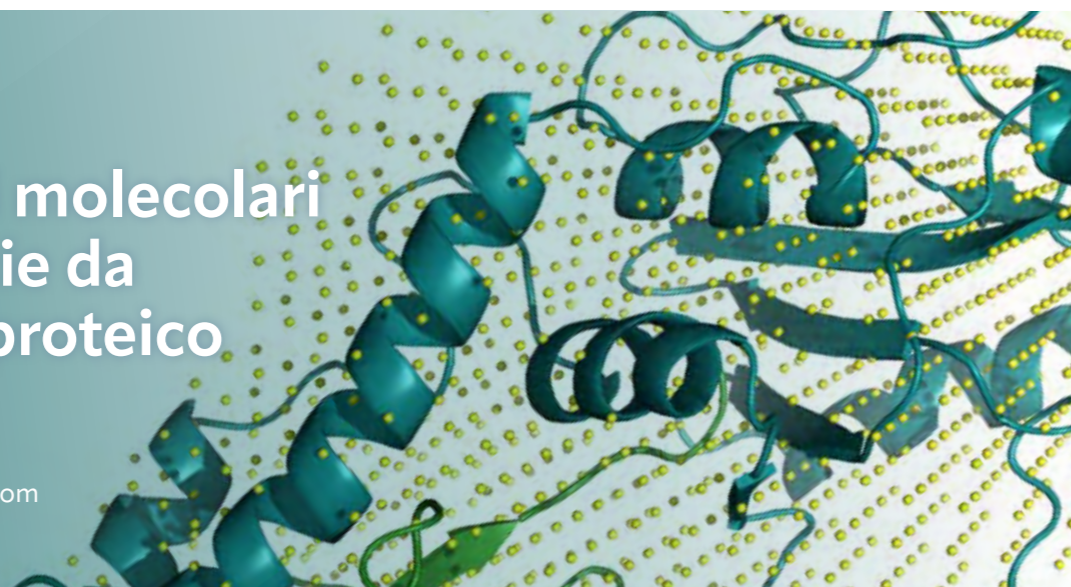


Fig.1: Organizzazione dei domini delle proteine LaRP. (A sinistra) Rappresentazione schematica dei domini delle LaRP umane. (Al centro) Strutture NMR dei domini La Motif e RRM1 della proteina Genuine La umana (PDB IDs: 1S7A, 1S79). (A destra) Descrizione dell'RNA riconosciuto da ciascuna LaRP (in verde) e *pathway* in cui la LaRP è coinvolta (in grigio).

PRODOTTI: **Farmaci chimici e biologici**

Meccanismi molecolari delle malattie da misfolding proteico

Caterina Alfano, PhD
calfano@fondazionerimed.com

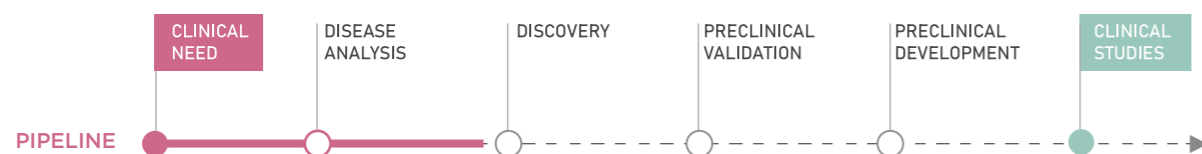


COLLABORAZIONI

- 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
- European Synchrotron Radiation Facility (ESRF) – Grenoble, Francia
- Dipartimento di Matematica e Fisica E. De Giorgi – Università del Salento, Lecce, Italia
- Institute of Nanotechnology (CNR Nanotec) – CNR, Lecce, Italia
- Institute of Experimental Neurology (INSPE) – IRCCS San Raffaele, Milano, Italia

AREA TERAPEUTICA

Neuroscienze



BREVE DESCRIZIONE

Le malattie neurodegenerative, la cui prevalenza si prevede aumenterà rapidamente nei prossimi decenni, rappresentano una sfida importante per la medicina e la salute pubblica. Sfortunatamente, i trattamenti attuali sono nel migliore dei casi palliativi e scarsamente efficaci, riflettendo una carente comprensione delle basi molecolari della maggior parte di queste malattie.

Sebbene ciascuna malattia neurodegenerativa sia caratterizzata da specifici sintomi clinici e da caratteristiche patologiche uniche, tutte condividono un meccanismo molecolare molto simile, caratterizzato dalla progressiva formazione di aggregati proteici. Nello specifico, una mutazione o un evento stocastico sono in grado di destabilizzare una specifica proteina,

diversa per ogni patologia neurodegenerativa, che perde il suo *folding* e si auto-organizza in strutture amiloidi insolubili, che si accumulano progressivamente all'interno della cellula formando inclusioni neurotossiche. Lo studio dei meccanismi di aggregazione proteica è dunque essenziale per progettare molecole in grado di competere specificamente con l'aggregazione.

In questo contesto, la nostra ricerca è focalizzata sullo studio dei meccanismi molecolari che portano all'aggregazione proteica e sulla caratterizzazione di interazioni specifiche proteina-ligando. In particolare, il nostro lavoro è attualmente mirato allo studio pato-fisiologico delle proteine Atassina-3 e TDP-43, coinvolte rispettivamente nell'Atassia Spino-cerebellare di tipo 3 (SCA3) e nella Sclerosi Laterale Amiotrofica (SLA).

IMPATTO

La mancanza di una profonda comprensione delle basi molecolari delle malattie neurodegenerative porta a terapie inefficienti e poco specifiche. Il presente progetto di ricerca affronta domande cruciali sia in biologia strutturale che cellulare, le cui risposte, una volta note, aiuteranno la comprensione dei meccanismi patologici di tali malattie. Le conoscenze acquisite aiuteranno nella progettazione di terapie specifiche e contestualmente forniranno importanti indizi sul fondamentale fenomeno del *folding* e assemblaggio delle proteine. L'approccio biofisico utilizzato, che prevede l'utilizzo di tecniche di spettroscopia, calorimetria e interferometria, rappresenta un potente strumento per i fini del progetto. Infatti, studi di biofisica e caratterizzazione strutturale di proteine altamente soggette ad aggregazione sono utili per definire meglio le basi molecolari di questo tipo di patologie in condizioni più facili da gestire, utilizzando saggi *in vitro* con proteine ricombinanti altamente pure. Le informazioni ottenute potranno essere utilizzate sia per la progettazione di composti antiaggreganti più specifici e più efficaci, in grado di interferire con il comportamento patologico di tali proteine, sia per validare innovativi modelli *in vitro* in grado di mimare la complessità dei sistemi *in vivo*.

RISULTATI RAGGIUNTI NEL 2021

Nell'ambito del progetto su Atassina-3, abbiamo prodotto forme progressivamente più patologiche della proteina. Abbiamo quindi effettuato misure della cinetica di aggregazione, mediante spettroscopia a fluorescenza, di tre forme di Atassina-3 con espansione crescente del tratto polyQ al C-terminale, corrispondente ad un grado di tossicità crescente. I risultati ottenuti mostrano le stesse caratteristiche di aggregazione per le tre forme di Atassina-3, confermando che, nelle condizioni sperimentali testate, il dominio catalitico di Atassina-3 (Josephin) funge da centro di nucleazione nel processo di aggregazione della proteina intera. Analogo risultato è stato ottenuto per le tre forme di Atassina-3 in cui è stato inattivato il sito catalitico mediante inserimento della mutazione puntiforme C14A. Questo ci ha permesso di validare i mutanti come modelli per lo studio dell'aggregazione di Atassina-3, sia *in vitro* che in cellula, in presenza di catene di poli-Ubiquitina, ligando naturale di

atassina-3 che subirebbe l'azione proteolitica in presenza delle forme *wild-type*.

Nell'ambito del progetto su TDP-43, sono stati prodotti con successo i due motivi di riconoscimento dell'RNA, RRM1 e RRM2. Questi sono stati quindi impiegati in studi biofisici preliminari volti a stabilire se esiste un'interazione specifica tra questi motivi isolati e l'epigallocatechina gallato (EGCG), un polifenolo naturale che ha già dimostrato, in studi svolti su altre proteine ad alta tendenza aggregativa, di possedere un'attività antiaggregante.

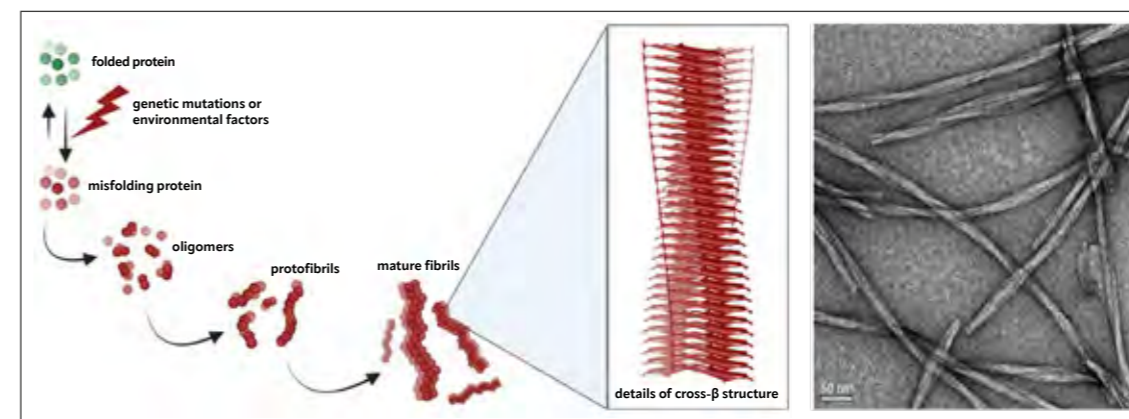
OBIETTIVI PER IL 2022

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 specifiche molecole con proprietà anti-aggreganti. 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. I risultati ottenuti dalle analisi biofisiche, seguiti da successivi studi in cellula, costituiranno un passo fondamentale per il futuro design di specifici composti peptidomimetici con funzione anti-aggregante.

Nell'ambito del progetto TDP-43, proseguiranno gli studi *in vitro* volti ad indagare l'interazione tra i diversi domini di TDP-43 e l'EGCG. Laddove l'interazione sarà confermata, verranno valutate le proprietà anti-aggreganti della molecola naturale sui singoli domini della proteina, permettendoci di ampliare la nostra conoscenza sul contributo di questi ultimi nel promuovere o mitigare i fenomeni aggregativi della proteina intera. I dati raccolti sull'interazione e sugli effetti anti-aggreganti della molecola naturale guideranno un eventuale design di composti derivanti dall'EGCG in grado di interferire più specificatamente con il processo aggregativo di TDP-43.

CONFERENZE

- BraYn - 4th Research Assembly for Young Neuroscientists, October, 2021, Pisa (Italy)
- 5th e-Workshop CNR Nanotec, November, 2021, online



Rappresentazione del pathway di aggregazione proteica.
(A sinistra) Le proteine associate a malattie neurodegenerative perdono la loro struttura nativa e si aggregano progressivamente, formando strutture supramolecolari insolubili [Immagine creata con BioRender.com].
(A destra) Immagine di fibrille mature di β -amilioide catturate mediante microscopia elettronica a trasmissione (da Gras et al. 2011).

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



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 metila-

zione 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 cata-

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 preclinica perché mancano di selettività e specificità per KDM4a rispetto ad altre demetilasi istoniche, modulando così altri target non desiderati.

litica di KDM4a. In particolare, il gruppo di Biologia Strutturale e Biofisica si è occupato di testare e caratterizzare l'interazione di KDM4a con diversi frammenti e piccole molecole selezionate attraverso un approccio di screening virtuale dal gruppo di Molecular Informatics.

Analisi cinetica mediante BLI dell'interazione tra KDM4a e molecole selezionate mediante virtual screening.

RISULTATI RAGGIUNTI NEL 2021

Questo progetto raccoglie uno sforzo interdisciplinare di diversi gruppi di ricerca in Ri.MED. Nel gruppo di Biologia Strutturale e Biofisica, abbiamo ottimizzato l'espressione e la purificazione del dominio catalitico KDM4a ricombinante ed eseguito studi di stabilità mediante risonanza magnetica nucleare e dicroismo circolare. 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_{dis} 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 Saturation-Transfer Difference (STD) per confermare eventuali fenomeni di binding. Alcuni frammenti hanno mostrato sia attività μM su KDM4 nel test di inibizione enzimatica, sia valori μM della costante di legame determinata mediante analisi biofisica. I dati sono stati quindi validati testando composti analoghi.

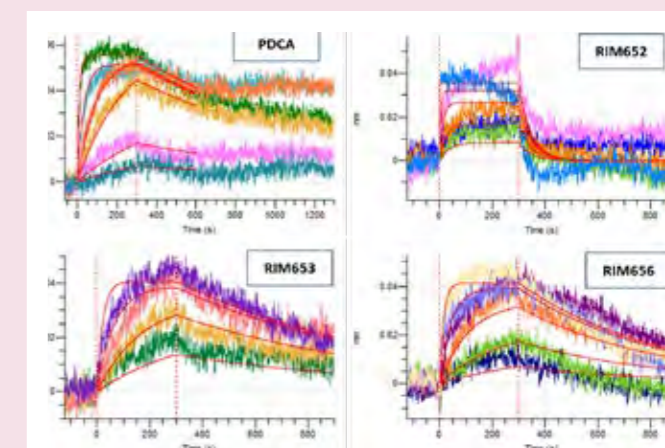
OBIETTIVI PER IL 2022

Il nostro obiettivo è completare una seconda campagna di screening. Se questa fornirà molecole con potenziali proprietà inibitorie, 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 ottimizzazione nella 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.



CONFERENZE

- CCPNMR Conference, August, 2021, online
- AIC School 2021 - Fundamentals of Crystallography: the theory behind the crystal structure solution. August, 2021, online



PRODOTTI: **Biomarcatori, farmaci biologici**

Il ruolo delle sequenze ripetute nella senescenza cellulare e nell'invecchiamento

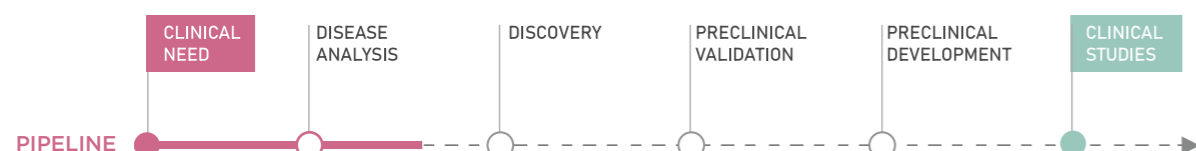
Walter Arancio, PhD
warancio@fondazionerimed.com

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

Patologie dell'invecchiamento - Neuroscienze



BREVE DESCRIZIONE

Le sequenze ripetitive di DNA (RS) rappresentano circa la metà del genoma umano. Nonostante siano state a lungo considerate solo "DNA spazzatura", ora è chiaro che abbiano un ruolo in quasi ogni aspetto della biologia umana, specialmente nell'invecchiamento e nelle malattie ad esso legate, oltre che nel cancro e nello sviluppo. Il ruolo delle RS è stato spesso trascurato perché sono difficili da studiare poiché sono necessarie specifiche procedure sperimentali e bioinformatiche; procedure che siamo in grado di eseguire. Tra molti altri ruoli, le RS sembrano avere un ruolo nell'innescare la senescenza cellulare che a sua volta è un fattore che guida il progresso dell'invecchiamento umano. La senescenza è uno stato di arresto

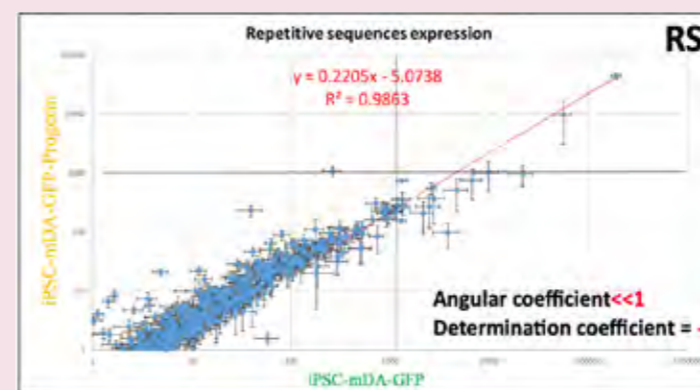
permanente del ciclo cellulare che induce un microambiente proinfiammatorio, solitamente transiente, grazie rimozione delle cellule senescenti ad opera dei macrofagi. Durante l'invecchiamento invece le cellule senescenti si accumulano, e a loro volta inducono uno stato infiammatorio cronico lieve che è probabilmente alla radice di molte malattie degli anziani, come le malattie cardiovascolari e degenerative, ma anche del rimodellamento dei tessuti come la fibrosi o addirittura il cancro. Una migliore comprensione del dialogo tra RS e senescenza cellulare può far luce su nuovi biomarcatori, bersagli terapeutici e approcci clinici per il trattamento dell'invecchiamento e delle malattie ad esso legate, e oltre ancora.

IMPATTO

Una pletera di prove si stanno accumulando nell'indicare che le RS svolgono un ruolo centrale nell'invecchiamento e nelle malattie ad esso legate. In particolare, a livello dei telomeri, le RS sono strettamente coinvolte con la senescenza replicativa ed, a livello centromerico, con stabilità cromosomica. È noto che le RS sono sottoposte a uno stretto meccanismo di controllo epigenetico basato sulla metilazione delle isole CpG. Durante l'invecchiamento, la distribuzione di questi marcatori epigenetici è alterata e le omologie di sequenza proprie delle RS divengono una piattaforma per la ricombinazione omologa, causando così a loro volta instabilità genomica, danni al DNA, senescenza e persino trasformazione tumorale. Inoltre, le RS di solito trasportano sequenze regolatorie, quindi la loro deregolazione e/o mobilitazione può alterare il profilo trascrizionale della cellula. L'attivazione della RS sembra una caratteristica generale delle cellule che acquisiscono il fenotipo senescente e recentemente è stato dimostrato che la derepressione della RS nelle cellule senescenti innescava l'infiammazione associata all'invecchiamento (inflammaging) attraverso la via di rilevamento del DNA citosolico (cGAS-STING), un componente del sistema immunitario innato antivirale. Per tutte queste ragioni, le RS sono potenziali bersagli rilevanti per il trattamento dei disturbi associati all'età.

RISULTATI RAGGIUNTI NEL 2021

L'alterazione dell'omeostasi cellulare causata dalle attività delle RS può essere mediata non solo dal loro stato epigenetico a livello della cromatina, ma anche dalla loro attività trascrizionale. Anche se le RS sono state a lungo considerate trascrizionalmente silenziose, è ora evidente che sono attivamente trascritte, che la loro trascrizione è strettamente regolata, e che essa ha un grande impatto sulla biologia della cellula. La pipeline per analizzare l'output trascrizionale delle RS in esperimenti di trascrittomica (via NGS) è stata perfezionata e testata in contesti diversi da quello originale (neuroni dopaminergici derivati da iPSC). Inoltre, gli studi sulla Sindrome da invecchiamento precoce di Hutchinson-Gilford sono proseguiti

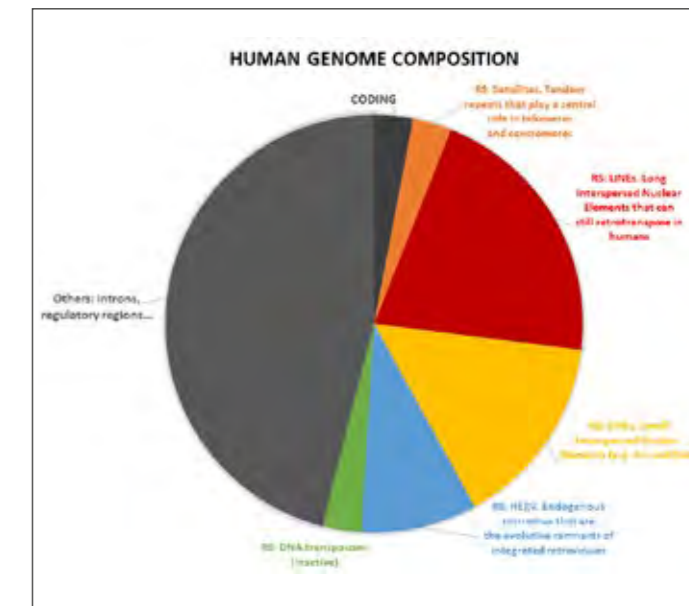


L'espressione della progerina induce una significativa downregolazione della trascrizione da sequenze ripetitive umane in neuroni dopaminergici derivati da iPSC.

parallelamente agli studi sulla caratterizzazione molecolare della senescenza cellulare e su possibili bersagli terapeutici e nuovi approcci farmacologici. Una proposta di finanziamento, dal titolo "Sequenze di DNA ripetitive e ruolo delle loro trascrizione nella sindrome di Hutchinson-Gilford" è stata presentata alla "Cariplo Telethon Alliance GJC2021".

OBIETTIVI PER IL 2022

Il nostro obiettivo è applicare la pipeline che abbiamo sviluppato per analizzare la trascrizione delle RS in un pannello di nuovi profili trascrittomici presenti in letteratura. In dettaglio, per comprendere meglio il ruolo delle RS, ci proponiamo di analizzare i trascrittomi ottenuti da un modello di fibroblasti della Sindrome di Hutchinson-Gilford per valutare il contributo delle RS in un modello di invecchiamento diverso dal setting neuronale come abbiamo fatto in precedenza. Vogliamo anche estendere l'analisi su campioni di malattie non legate all'invecchiamento come il cancro al seno e l'autismo. In quest'ultimo in particolare, i nostri dati preliminari sono molto promettenti. Sempre più evidenze suggeriscono che il ruolo della RS differisca da tessuto a tessuto, ad es. le RS sembrano avere un ruolo fisiologico nello sviluppo del cervello mentre possiedono un effetto patologico quando sono espresse nell'endotelio e in molte forme di cancro.



Circa la metà del genoma umano è composto da sequenze di DNA ripetitive (RS). Le RS hanno un ruolo centrale nella biologia umana, ma sono probabilmente la parte del genoma umano che è stata meno studiata e compresa.

PRODOTTI: Biomarcatori

Ruolo degli inflammasomi nell'infiammazione polmonare associata al fumo di sigaretta

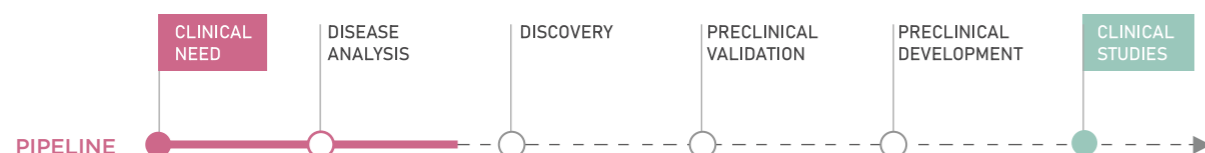
Chiara Cipollina, PhD
ccipollina@fondazionerimed.com

COLLABORAZIONI

- Istituto per la Ricerca e l'Innovazione Biomedica (IRIB) - CNR, Palermo, Italia
- Istituto di Farmacologia Traslazionale (IFT) - 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 (BiND) Università degli Studi di Palermo, Palermo, Italia

AREA TERAPEUTICA

Patologie dell'invecchiamento



BREVE DESCRIZIONE

Il fumo di sigaretta (FS) è uno dei principali fattori di rischio per le malattie infiammatorie croniche delle vie aeree come la broncopneumopatia cronica ostruttiva (BPCO). L'esposizione a FS causa disfunzione della barriera epiteliale polmonare, rimodellamento delle vie aeree e compromissione della risposta immunitaria innata, aumentando così il rischio di infezione. Recenti sforzi per la scoperta di nuovi farmaci si sono concentrati sui pathway infiammatori. Gli inflammasomi partecipano alla risposta immunitaria innata e sono potenzialmente coinvolti nelle malattie polmonari associate a FS. Gli inflammasomi sono complessi multiproteici composti da un recettore, una proteina adattatrice, nota come ASC, e la pro-caspasi-1. L'attivazione dell'inflammasoma promuove l'attivazione autocatalitica della caspasi-1, che a sua volta attiva pro-IL-1 β , pro-IL-18 e gasdermin D (GSDMD). In seguito ad attivazione, GSDMD

forma pori sulle membrane cellulari, consentendo il rilascio delle citochine mature e aumentando la permeabilità portando infine a una morte cellulare litica e pro-infiammatoria nota come piroptosi.

Il nostro gruppo ha di recente scoperto che FS inibisce l'inflammasoma NLRP3 nei macrofagi umani e nel contempo promuove l'attivazione della caspasi-1 attraverso il pathway TLR4-TRIF-caspasi-8. In presenza di lipopolisaccaride batterico (LPS), FS sposta la risposta infiammatoria dall'asse MyD88-NF- κ B (inibito da FS) a TRIF-caspasi-8 promuovendo l'attivazione della caspasi-1. Questo genera una alterata risposta all'infezione batterica. Durante il 2021, abbiamo studiato l'impatto del FS sulla GSDMD e sugli eventi a valle nei macrofagi primari umani, nei macrofagi polmonari e nelle cellule strutturali polmonari.

IMPATTO

Il progetto contribuirà alla scoperta e alla caratterizzazione del ruolo degli inflammasomi, delle caspasi non apoptotiche e di GSDMD nella patogenesi delle malattie polmonari associate al fumo di sigaretta. Espandendo la nostra indagine oltre le cellule immunitarie, scopriremo se gli inflammasomi hanno un ruolo anche nelle cellule strutturali polmonari, comprese le cellule epiteliali bronchiali e i fibroblasti, e contribuiscono all'infiammazione cronica, al danno tissutale e al rimodellamento delle vie aeree. Questo lavoro mira a identificare nuovi potenziali bersagli terapeutici per il trattamento delle malattie polmonari associate a CS.

L'impatto di questo lavoro andrà oltre il contesto specifico delle malattie polmonari. Infatti, l'attivazione dell'inflammasoma contribuisce alla patogenesi di diverse malattie croniche tra cui l'aterosclerosi, il diabete di tipo II e le malattie neurodegenerative. Pertanto, i risultati derivati da questo progetto avranno un impatto più ampio in diversi campi di ricerca.

RISULTATI RAGGIUNTI NEL 2021

Nel 2021 abbiamo studiato l'impatto del FS sull'attivazione di GSDMD nei macrofagi derivati da monociti umani (hMDMs) e nelle sezioni di tessuto polmonare distale di soggetti fumatori e controlli non fumatori. In hMDMs abbiamo scoperto che CSE \pm LPS promuove l'attivazione di GSDMD e aumenta la permeabilità cellulare, in assenza di morte (Fig. 1). L'attivazione di GSDMD è assente in risposta a LPS, mentre è notevolmente aumentata in presenza di LPS+FS, suggerendo un effetto sinergico tra i due stimoli. Abbiamo scoperto che FS promuove l'internalizzazione di LPS portando all'attivazione della caspasi-4, contribuendo così ad aumentare l'attivazione di GSDMD. A confermare la rilevanza di questi dati, è stato l'aumento significativo di GSDMD attiva osservato nei macrofagi polmonari di soggetti fumatori rispetto ai controlli non fumatori (Fig. 2). I nostri risultati hanno rivelato che una maggiore attivazione di caspasi-1, -4 e -8 e GSDMD in seguito all'esposizione a FS può promuovere la disfunzione dei macrofagi polmonari e contribuire all'infiammazione cronica e irrisolta osservata nel polmone dei fumatori.

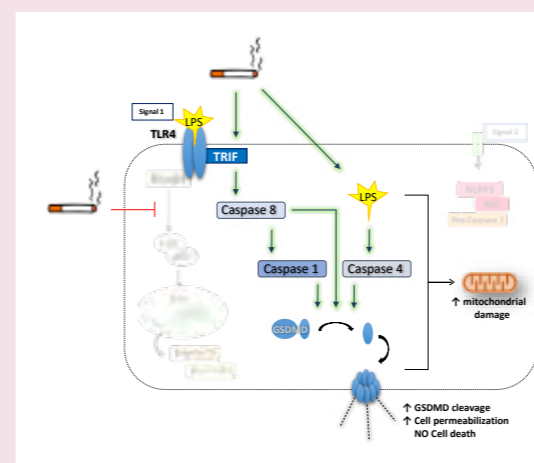


Figura 1. Modello proposto. Il fumo di sigaretta altera la risposta infiammatoria all'LPS: il pathway TLR4-MyD88 è inibito e non avviene l'attivazione dell'inflammasoma NLRP3. Caspasi-8, -1 e -4 e conseguentemente GSDMD si attivano, aumentando la permeabilità cellulare in assenza di morte. L'attivazione di caspasi e GSDMD portano al danno mitocondriale.

Inoltre, nel corso del 2021, abbiamo messo a punto con successo diversi modelli sperimentali avanzati per lo studio delle malattie polmonari in collaborazione con IRIB-CNR, Università di Palermo e IRCCS-ISMETT. Abbiamo stabilito protocolli per l'isolamento e la coltura di cellule epiteliali bronchiali primarie, fibroblasti primari e macrofagi alveolari da campioni di tessuto polmonare fresco. Attualmente stiamo studiando il ruolo degli inflammasomi in colture monostrato e in modelli 3D *air-liquid interface* (ALI) esposti a CS.

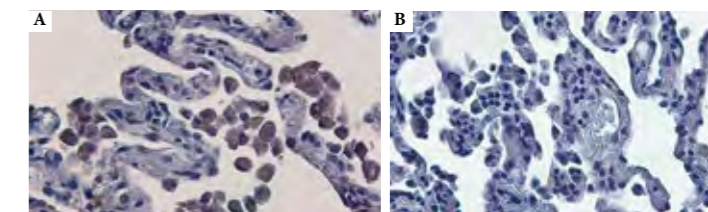


Figura 2. GSDMD attiva (immunoistochimica) in sezioni polmonari distali di Fumatori (A) e Non Fumatori (B).

OBIETTIVI PER IL 2022

Durante il 2022, studieremo l'impatto dell'esposizione a lungo termine al FS sulla morte cellulare nel contesto dell'infezione batterica. In particolare, verificheremo l'ipotesi che l'esposizione a FS, oltre a inibire le risposte infiammatorie protettive, predisponga i macrofagi ad un tipo di morte cellulare pro-infiammatoria durante le infezioni batteriche. E questo può sostenere l'infiammazione cronica e favorire l'aumento del rischio di infezione osservato nei soggetti fumatori. Inoltre, indagheremo l'impatto dell'infezione virale (usando poly(I:C) come modello di stimolazione) sull'attivazione dell'inflammasoma e delle gasdermine. Infine, valuteremo l'impatto dell'esposizione a FS in fibroblasti polmonari (utilizzando la linea cellulare MRC5 e fibroblasti primari) e le cellule epiteliali bronchiali primarie coltivate in monostrato e in modelli ALI 3D con particolare attenzione alle risposte correlate all'inflammasoma.

CONFERENZE

- *Cigarette smoke induces ASC-independent and caspase-dependent activation of Gasdermin D in human macrophages.* Cristaldi M, Buscetta M, Cimino M, Amato S, Aronica TS, Cipollina C. EMBO Workshop The inflammasomes: The next frontier 21 - 24 September 2021, Martinsried, Germany.
- *Development of a screening strategy for the identification of NLRP3 selective inhibitory compounds.* Dino P, Buscetta M, Zito G, Bucchieri F, Cipollina C. 93° Congresso Nazionale Società Italiana di Biologia Sperimentale (SIBS), 22-25 Aprile 2021 Palermo, Italia.

PUBBLICAZIONI

- Di Vincenzo S, Sangiorgi C, Ferraro M, Buscetta M, Cipollina C, Pace E (2021) Cigarette smoke extract reduces FOXO3a promoting tumor progression and cell migration in lung cancer. *Toxicology*, 454:152751. DOI: 10.1016/j.tox.2021.152751.
- Chiappara G, Di Vincenzo S, Sangiorgi C, Di Sano C, D'Anna C, Zito G, Cipollina C, Vitulo P, Bertani A, Pace E. (2022) Cigarette smoke upregulates Notch-1 signaling pathway and promotes lung adenocarcinoma progression. *Toxicol Lett.* 355:31-40. DOI: 10.1016/j.toxlet.2021.11.002.

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

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, Italia
- Dipartimento di Biomedicina, Neuroscienze e Diagnostica avanzata (BIND), Università di Palermo, Italia
- Unità di Medicina Nucleare, Fondazione Istituto G.Giglio, Cefalù, Italia
- Dipartimento di Ingegneria, Università di Palermo, Italia
- Unità di Fisica Medica, Ospedale Cannizzaro, Catania, Italia
- Dipartimento di Medicina Nucleare, Ospedale Cannizzaro, Catania, Italia

AREA TERAPEUTICA

Oncologia



BREVE DESCRIZIONE

La radiomica rappresenta una nuova frontiera della medicina basata sull'estrazione di dati quantitativi dalle immagini radiologiche 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.

Figura 1. Il flusso di lavoro radiomico dello studio. (a) Immagine PET con segmentazione della lesione basata sul metodo di soglia (vedere Sezione 2.1). (b) Alcuni esempi delle 44 caratteristiche estratte usando il software LifeX, come curiosità, skewness, entropia e due caratteristiche strutturali sotto forma di matrice (vedi Sezione 2.2). (c) Selezione delle caratteristiche usando un approccio sequenziale misto descrittivo-inferenziale (vedere la Sezione 2.2.3). (d) Figura rappresentativa della classificazione delle caratteristiche biplanari (grado tumorale basso e alto) utilizzando l'analisi discriminante come classificatore supervisionato. In particolare, a scopo di addestramento è stata utilizzata una serie di istanze etichettate (di grado tumorale basso e alto). Successivamente, il classificatore è stato utilizzato per prevedere l'etichetta nel set di test, in cui le istanze erano prive di etichette corrispondenti.

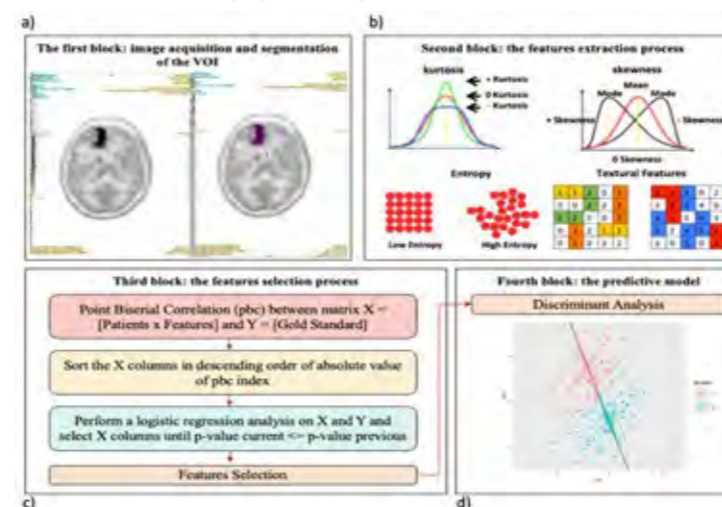
IMPATTO

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 2021

Il progetto ha contribuito a:

- Sviluppare un nuovo metodo per la selezione delle caratteristiche radiomiche basato sulle matrici di correlazione e coefficiente di correlazione biseriale per la riduzione e la selezione delle caratteristiche e l'uso dell'analisi discriminante (DA) per la classificazione delle caratteristiche in un intero campione e sottogruppi per tumore primario o recidiva locale (T), malattia nodale (N) e malattia metastatica (M);
- 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 nuova stadiazione;
- Osservare la variabilità delle caratteristiche radiomiche della tomografia a emissione di positroni (PET) sotto l'impatto della co-registrazione con la risonanza magnetica (MRI) utilizzando il coefficiente percentuale di differenza e il coefficiente di correlazione di Spearman per tre gruppi di immagini: (i) PET originale, (ii) PET dopo la co-registrazione con la risonanza magnetica T1 e (iii) PET dopo la co-registrazione con la risonanza magnetica FLAIR;
- Determinare le prestazioni diagnostiche dell'analisi della tessitura della risonanza magnetica prostatica per la diagnosi di cancro alla prostata tra le lesioni Prostate Imaging Reporting and Data System (PI-RADS) 3.



OBIETTIVI PER IL 2022

Durante il 2022, miriamo a sviluppare una nuova matrice radiomica 3D per scoprire nuovi indici prognostici per eseguire una valutazione precoce della risposta al trattamento alla terapia utilizzando metodi di imaging. 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 nel 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

- G. Russo, A. Stefano, P. Alongi, A. Comelli, B. Catalfamo, C. Mantarro, C. Longo, R. Altieri, F. Certo, S. Cosentino, MG. Sabini, S. Richiusa, GMV. Barbagallo, and M.Ippolito. Feasibility on the Use of Radiomics Features of ¹¹C]-MET PET/CT in Central Nervous System Tumours: Preliminary Results on Potential Grading Discrimination Using a Machine Learning Model. *Current Oncology*. 2021; 28(6):5318-5331. DOI 10.3390/curroncol28060444.
- F. Vernuccio, F. Arnone, R. Cannella, B. Verro, A. Comelli, F. Agnello, A. Stefano, R. Gargano, V. Rodolico, G. Salvaggio, R. Lagalla, M. Midiri and A. Lo Casto. Diagnostic performance of qualitative and radiomics approach to parotid gland tumors: which is the added benefit of texture analysis?. *The British Journal of Radiology*, 94, 20210340. DOI 10.1259/bjr.20210340.
- S. Barone, R. Cannella, A. Comelli, A. Pellegrino, G. Salvaggio, A. Stefano and F. Vernuccio. Hybrid descriptive-inferential method for key feature selection in prostate cancer radiomics. *Applied Stochastic Models in Business and Industry*, 37(5), 961-972. DOI 10.1002/asmb.2642.
- G. Cutaia, G. La Tona, A. Comelli, F. Vernuccio, F. Agnello, C. Gagliardo, L. Salvaggio, N. Quartuccio, L. Sturiale, A. Stefano, M. Calamia, G. Arnone, M. Midiri, G. Salvaggio. Radiomics and Prostate MRI: Current Role and Future Applications. *Journal of Imaging*. 2021; 7(2):34. DOI 10.3390/jimaging7020034.
- A. Stefano, A. Leal, S. Richiusa, P.T rang, A. Comelli, V. Benfante, S. Cosentino, MG. Sabini, A. Tuttolomondo, R. Altieri, F. Certo, GMV. Barbagallo, M. Ippolito, G. Russo. Robustness of PET Radiomics Features: Impact of Co-Registration with MRI. *Applied Sciences*. 2021; 11(21):10170. DOI 10.3390/app112110170.
- P. Alongi, A. Stefano, A. Comelli, R. Laudicella, S. Scalisi, G. Arnone, S. Barone, M. Spada, P. Purpura, T. V. Bartolotta, M. Midiri, R. Lagalla and G. Russo. Radiomics analysis of 18F-Choline PET/CT in the prediction of disease outcome in high-risk prostate cancer: an explorative study on machine learning feature classification in 94 patients. *Eur Radiol* (2021). DOI 10.1007/s00330-020-07617-8.

PRODOTTI: **Biomarcatori, Dispositivi biomedicali e Organi artificiali**



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

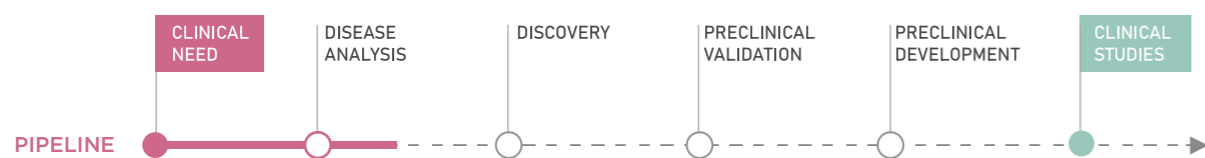
Albert Comelli, PhD
acomelli@fondazionerimed.com

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
- Dipartimento di Medicina e Chirurgia Clinica, Università degli Studi di Napoli "Federico II", Napoli, Italia

AREA TERAPEUTICA

Oncologia



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 (cioè 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 otte-

nere 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 designata per identificare il tumore. Per questo motivo, è obbligatorio un metodo di delineazione degli obiettivi automatico e indipendente dall'operatore.

Figura 1. Esempi di corretta segmentazione per le reti di deep learning per l'intera ghiandola (colonna sinistra), transizione (colonna centrale) e zona periferica (colonna di destra). La segmentazione manuale (giallo), ENet (rosso), ERFNet (blu) e U-Net (verde) sono sovrapposte.

Figure 2. Immagini CT che mostrano il parenchima con sottoregioni visibili (giallo per il gold standard, C-ENet, verde per ENet e blu per ERFNet infettate dalla malattia COVID-19).

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 del cervello in PET.
- Un framework di apprendimento profondo per la segmentazione della ghiandola prostatica e delle sue zone, dell'aorta aneurismatica e della sua valvola ma anche del regioni infette da COVID-19 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 2021

Il progetto ha contribuito a:

- Sviluppare un approccio di deep learning personalizzato volto ad affrontare l'identificazione e la segmentazione in tempo reale e completamente automatizzate delle regioni infette da COVID-19 nelle immagini di tomografia computerizzata.
- Progettare un approccio di deep learning il cui obiettivo è affrontare il processo di delineazione completamente automatizzato, in tempo reale e 3D dell'intera ghiandola prostatica, della zona centrale + stroma anteriore + zona di transizione (TZ) e della zona periferica (PZ) segmentazione su risonanza magnetica T2;
- Dimostrare che i modelli di deep learning 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;
- Progettare algoritmi di segmentazione efficienti e indipendenti dall'operatore in grado di ricostruire la forma tridimensionale (3D) della lesione al cervello per diagnosi accurate e pianificazione del trattamento radioterapico.

Figura 1

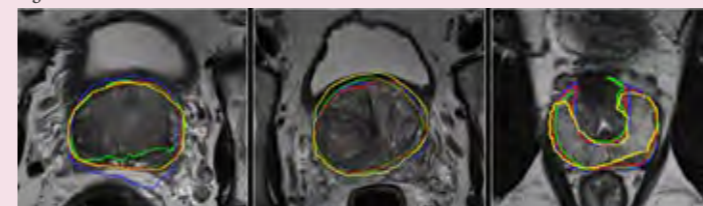
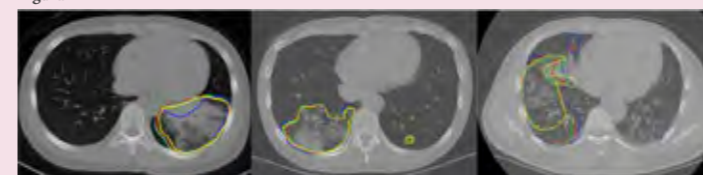


Figura 2



OBIETTIVI PER IL 2022

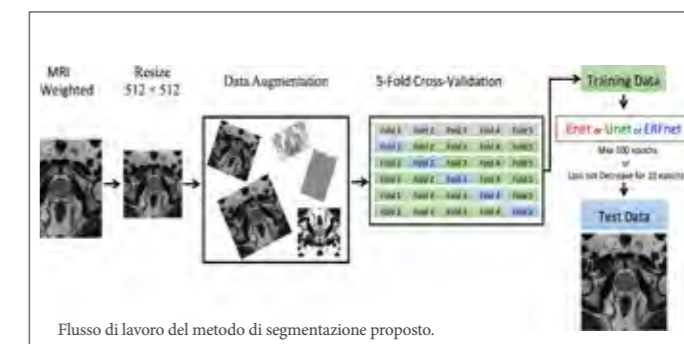
Nel 2022 l'obiettivo principale sarà quello di sviluppare metodi di segmentazione efficienti e indipendenti dall'operatore in grado di ricostruire la forma 3D della lesione. Questi nuovi metodi saranno ispirati da algoritmi di segmentazione del contorno attivo locale guidati da algoritmi di intelligenza 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 indipendente dal metodo di acquisizione.

CONFERENZE

25th International Conference on Pattern Recognition, January, 2021, Milano (IT)

PUBBLICAZIONI

- A. Comelli, N. Dahiya, A. Stefano, F. Vernuccio, M. Portoghesi, G. Cutaia, A. Bruno, G. Salvaggio, A. Yezzi. Deep Learning-Based Methods for Prostate Segmentation in Magnetic Resonance Imaging. *Applied Sciences*. 2021; 11(2):782. DOI 10.3390/app11020782.
- R. Laudicella, A. Comelli, A. Stefano, MSzostek, L. Crocè, A. Vento, A. Spataro, A. Comis, F. La Torre, M. Gaeta, S. Baldari and P. Alongi. Artificial neural networks in cardiovascular diseases and its potential for clinical application in molecular imaging. *Current Radiopharmaceuticals*, 14(3), 209-219. DOI 10.2174/1874471013666200621191259.
- A. Stefano, A. Comelli. Customized Efficient Neural Network for COVID-19 Infected Region Identification in CT Images. *Journal of Imaging*. 2021; 7(8):131. DOI 10.3390/jimaging7080131.
- R. Cuocolo, A. Comelli, A. Stefano, V. Benfante, N. Dahiya, A. Stanzione, A. Castaldo, D.R. De Lucia, A. Yezzi and M. Imbriaco. Deep learning whole-gland and zonal prostate segmentation on a public MRI dataset. *Journal of Magnetic Resonance Imaging*. 2021. DOI 10.1002/jmri.27585.
- A. Comelli and A. Stefano. Active Surface for Fully 3D Automatic Segmentation. In: Del Bimbo A. et al. (eds) *Pattern Recognition. ICPR International Workshops and Challenges. ICPR 2021. Lecture Notes in Computer Science*, vol 12661. Springer, Cham. DOI: 10.1007/978-3-030-68763-2_27
- R. Laudicella, A. Igaru, A. Comelli, S. Baldari, I.A. Burger. Artificial Intelligence Clinical Application in Prostate Cancer Molecular Imaging. *Hematology*, 1(7), 28-35. DOI 10.36000/hbT.OH.2021.07028.



Flusso di lavoro del metodo di segmentazione proposto.

PRODOTTI: **Biomarcatori, farmaci biologici**

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

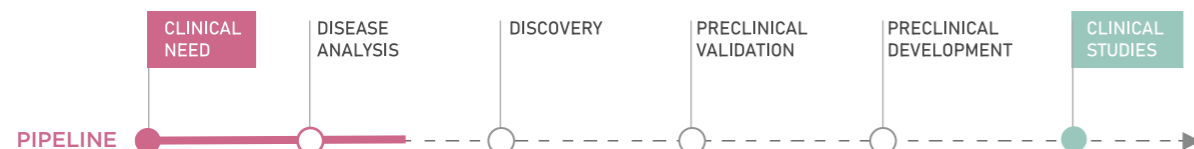
Claudia Coronello, PhD
ccoronello@fondazionerimed.com

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



BREVE DESCRIZIONE

I microRNA sono piccoli filamenti di RNA con importanti funzioni regolatorie 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 presente è diversa in ciascun tessuto. In questo progetto, ci proponiamo di modellizzare le

reti di interazione, 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 loro target in tessuti diversi.

IMPATTO

Ricchissime sono oggi le banche dati che rendono pubblicamente accessibili Big Data biologici. Infatti, è apprezzata e incentivata la condivisione dei dati utilizzati per ottenere i risultati descritti nelle riviste scientifiche internazionali. Ad esempio, i profili di espressione genica, sono depositati in banche dati come Gene Expression Omnibus o ArrayExpress. Chiunque sia interessato ad un particolare tessuto cellulare avrà già a disposizione un corredo di profili di espressione da studi già pubblicati. Tali dati offrono 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 futura 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 sotto esame.

RISULTATI RAGGIUNTI NEL 2021

Nel 2021 ci siamo dedicati a uno studio focalizzato su due proteine coinvolte nel complesso RISC, ovvero AGO2 e GW182. Grazie alle collaborazioni con IRIB-CNR e STEBICEF-UNIPA abbiamo realizzato un ricco database di profili di espressione genica. In particolare, sono stati raccolti dati relativi a due linee cellulari, MCF7 e MDA, in entrambe delle quali sono state ultimate le seguenti tipologie di esperimenti in triplicato: 1) Immunoprecipitazione della proteina AGO2, 2) silencing della proteina AGO2, con conseguente immunoprecipitazione della proteina GW182, 3) Immunoprecipitazione della proteina GW182 e 4) silencing della proteina GW182, con conseguente immunoprecipitazione della proteina

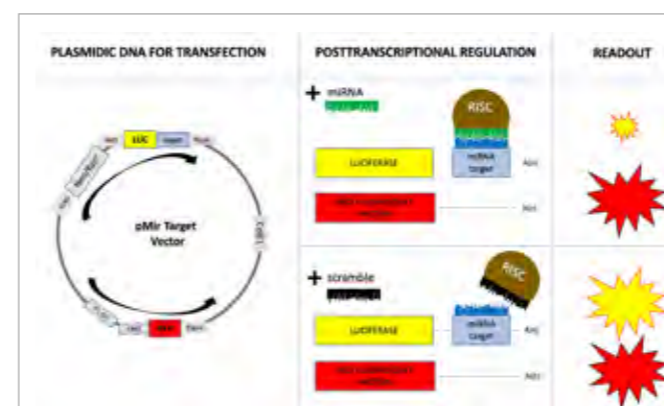


Fig. 1: la trasfezione di un opportuno plasmide in cellule umane coltivate permette di rilevare la regolazione posttrascrizionale ad opera del complesso RISC valutando la down-regolazione dell'attività della luciferasi il cui messaggero porta il 3'UTR del gene di interesse in esperimenti di cotrasfezione con opportuni miRNA precedentemente selezionati *in silico*. La normalizzazione si effettua tramite un gene reporter codificato dallo stesso plasmide ma insensibile alla stessa regolazione posttrascrizionale.

AGO2. Tutte le frazioni e i campioni ottenuti sono stati raccolti ed analizzati con tecnologia microarray, per ottenerne il profilo di espressione genica. E' in corso lo studio dei dati trascrittomici così ottenuti. In parallelo, stiamo ottimizzando, grazie alla collaborazione con ISMETT, protocolli sperimentali per la validazione *in vitro* delle interazioni miRNA-RNA target, attraverso saggi di luciferasi.

OBIETTIVI PER IL 2022

Nel 2022 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, un web-tool da noi sviluppato per predire i target di set di microRNA. 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 degli RNA messaggeri, utilizzandolo per calcolare il network di interazione con il nostro algoritmo. Ci aspettiamo di migliorare le predizioni di target ottenute dalla versione originale di ComiR, in primo luogo perché ci limiteremo a considerare solo i geni effettivamente espressi nel tessuto in esame. In secondo luogo, anche le interazioni microRNA - RNA messaggero saranno limitate a quelle predette come funzionali dal nostro algoritmo, e confidiamo di dimostrare e validare la sua efficacia riscontrando un ulteriore aumento di performance nell'individuazione dei target.

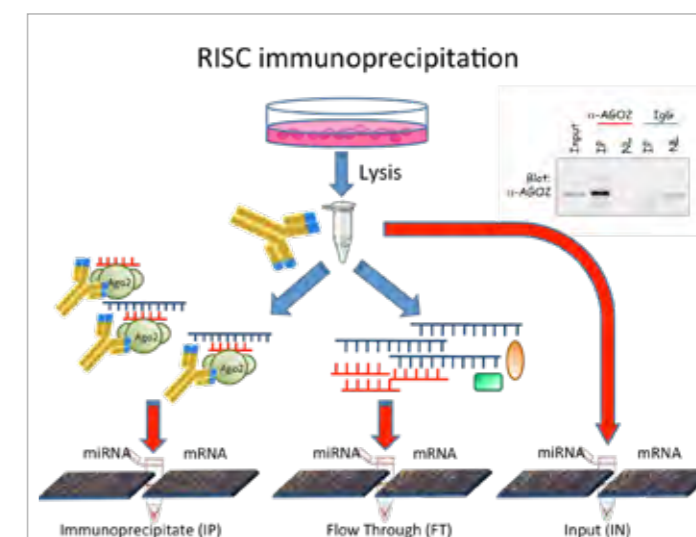


Fig. 2: Disegno sperimentale RIP-Chip. Dal lisato cellulare vengono separate due frazioni attraverso l'immunoprecipitazione di una proteina del complesso RISC. Viene quindi estratto e analizzato attraverso microArray l'RNA dei tre campioni ottenuti, ovvero il lisato totale (IN), la frazione immunoprecipitata (IP) e la frazione residua (FT).

PRODOTTI: Farmaci

Progettazione e sintesi di nuovi potenziali inibitori di KDM4a

Maria De Rosa, PhD
mderosa@fondazionerimed.com



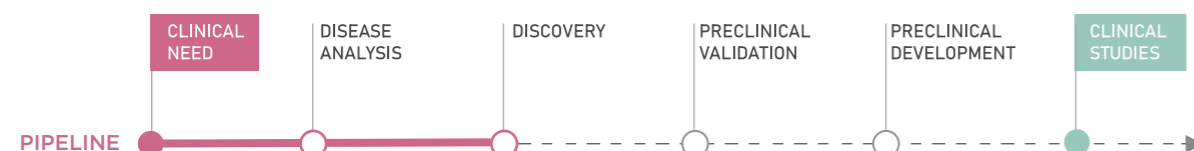
COLLABORAZIONI

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



AREA TERAPEUTICA

Oncologia



BREVE DESCRIZIONE

La scoperta di nuovi farmaci efficaci e selettivi è un processo impegnativo e la prima fase di *early discovery* richiede l'interazione di diverse competenze interconnesse. In Ri.MED abbiamo implementato un'area interdisciplinare di Drug Discovery finalizzata all'identificazione di nuovi principi attivi. Recentemente, è stata completata la prima campagna di screening per il target KDM4a, un enzima appartenente alla sottofamiglia JmjC 2-ossoglutarato-dipendente (KDM2-7) e che catalizza la rimozione di gruppi di- e trimetile dagli istoni H3K9 e H3K36. Le modifiche post-traslazionali del DNA e degli istoni sono componenti importanti della regolazione epigenetica e rappresentano eventi essenziali nel controllo della struttura e

della funzione della cromatina; la metilazione è infatti il marker epigenetico più studiato. Pertanto, KDM4a è un target attraente e sembra essere frequentemente over-espresso in diversi tumori umani, come il carcinoma ovarico e del colon. La campagna di virtual screening a partire da librerie commerciali di frammenti ha portato all'identificazione di un attivo preliminare (IC₅₀ di 7,1 μM) in grado di legare il dominio catalitico di KDM4a. Questo frammento è stato utilizzato come punto di partenza per la progettazione e la sintesi di nuovi chemotipi. In particolare, il nucleo della carbossipiridina è stato incluso in scaffold biciclici utilizzando un approccio di bioisosterismo volto a identificare hits più potenti e con elevato potenziale di brevettabilità.

IMPATTO

Alterazioni aberranti nella struttura della cromatina e la sua disfunzione sono cause comuni nei tumori e diversi enzimi coinvolti nelle modificazioni post-traslazionali del DNA e dell'istone (l'acetilazione, la metilazione, la demetilazione e l'ubiquitinazione) sono stati validati come bersagli terapeutici in oncologia. È importante sottolineare che i farmaci in grado di inibire gli enzimi epigenetici possono agire in maniera duplice, prevenendo la formazione delle cellule progenitrici del cancro, e uccidendo le cellule cancerose che in genere sono resistenti ai classici trattamenti chemioterapici. Una over-espressione di KDM4a è stata riportata in diversi tipi di cancro, come il carcinoma alla prostata, alla vescica, al colon-retto, delle cellule squamose, del polmone e della mammella. C'è pertanto un grande interesse per la comunità scientifica verso lo sviluppo di farmaci chimici in grado di inibire l'attività enzimatica di KDM4a. Sono già stati identificati e sviluppati diversi inibitori di KDM4a ma nessuno di essi ha superato gli studi di fase clinica a causa della mancanza di selettività e specificità. Ad oggi infatti, non sono disponibili sul mercato farmaci in grado di inibire questo target.



RISULTATI RAGGIUNTI NEL 2021

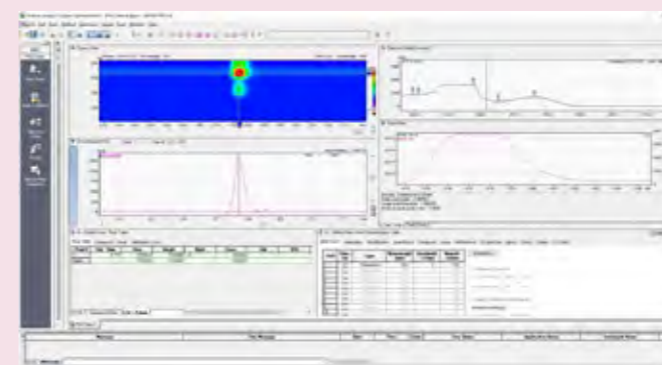
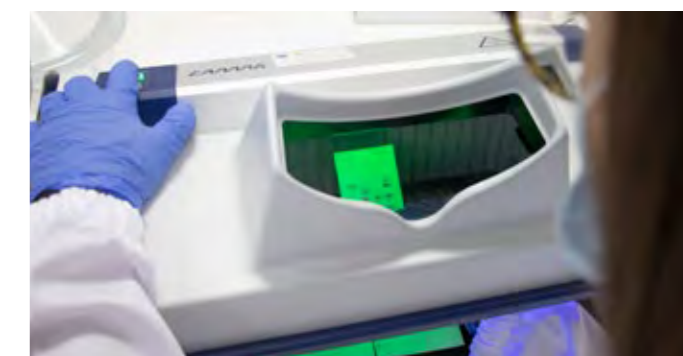
Durante l'anno 2021, ci siamo dedicati principalmente alla progettazione razionale di chemotipi innovativi a partire dalla struttura carbossipiridinica del frammento emerso come composto interessante dalla campagna di screening. In particolare, sono stati disegnati tre chemotipi, e cioè, i) le tetraidrocarboline, ii) i naftiridinoni e iii) le pirazolo-piridazine. Per ogni classe, sono stati elaborati un centinaio di analoghi strutturali. Inoltre, è stata progettata una via sintetica che fosse fattibile ed economica sia in termini di dispendio economico che di tempo. Una selezione di analoghi per ciascun scaffold è stata oggetto di studio *in silico* condotto dal gruppo di Molecular Informatics. L'idea era quella di valutare se le nuove strutture riproducessero il *binding mode* del *lead compound* per eccellenza, e cioè il QC6352 o se in qualche modo riuscissero ad occupare una tasca idrofobica individuata all'interno del sito attivo catalitico, al fine di ottenere inibitori di tipo allosterico e diversi dai classici inibitori competitivi analoghi dell'ossoglutarato. A tal scopo, per gli studi di docking, sono stati

utilizzati cinque pdb della proteina KDM4a co-cristallizzata con inibitori noti. Le attività di sintesi sono state organizzate sulla base della prioritizzazione dei composti emersa dallo studio computazionale. In particolare, ci siamo concentrati sullo studio e ottimizzazione della via sintetica delle tetraidro-carboline.



OBIETTIVI PER IL 2022

Durante il prossimo anno, miriamo a completare l'ottimizzazione della via sintetica di tutti i chemotipi. Le attività di sintesi prevedono, per ogni step, una valutazione della reattività degli intermedi di reazione e delle condizioni migliori di reazione, al fine di ottenere i prodotti attesi con le rese più alte e utilizzando il più possibile condizioni green. Per ciascun intermedio di nuova sintesi, sarà eseguita una caratterizzazione analitica completa attraverso tecniche di spettroscopia NMR (¹H e ¹³C) e spettrometria di massa. I composti finali o *title compounds* che saranno valutati biologicamente, saranno purificati in cromatografia liquida ad alta risoluzione (HPLC), al fine di ottenerli con una purezza superiore al 96%. Il goal è quello di completare la sintesi di una mini serie di composti rappresentativi di ciascun chemotipo, i quali verranno poi testati *in vitro*, nel saggio enzimatico primario, dal gruppo HTS. I risultati dello screening biologico saranno fondamentali per l'identificazione di potenziali hits. Seguirà una fase di ottimizzazione strutturale delle molecole più promettenti e attraverso uno studio approfondito delle relazioni struttura-attività (SAR) esploreremo lo spazio chimico dei composti biologicamente interessanti.



Risultato della corsa analitica di un campione di una miscela di reazione in UHPLC-MS e verifica della presenza dello ione molecolare del prodotto atteso.



PUBBLICAZIONI

- Mekni, N.; Coronello, C.; Langer, T.; De Rosa, M.; Perricone, U. (2021). Support Vector Machine as a Supervised Learning for the Prioritization of Novel Potential SARS-CoV-2 Main Protease Inhibitors. *Int. J. Mol. Sci.*, 22, 7714 (1-20). doi.org/10.3390
- Sharma, A.; De Rosa, M.; Singla, N.; Singh, G.; Barnwal, R. P.; Pandey, A. (2021). Tuberculosis: An Overview of the Immunogenic Response, Disease Progression, and Medicinal Chemistry Efforts in the Last Decade toward the Development of Potential Drugs for Extensively Drug-Resistant Tuberculosis Strains. *J. Med. Chem.* 64(8), 4359–4395. doi.org/10.1021/acs.jmedchem.0c01833

PRODOTTI: **Farmaci**

Progettazione e sintesi di nuovi potenziali inibitori dell'Inflammasoma NLRP3

Maria De Rosa, PhD
mderosa@fondazionerimed.com

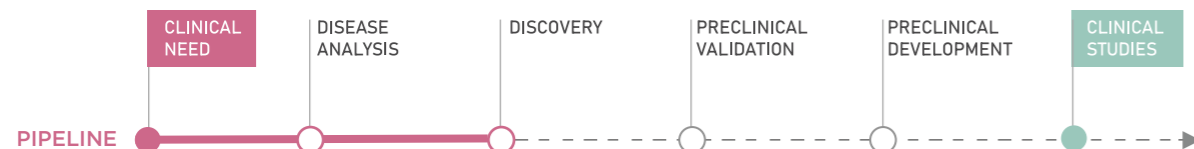


COLLABORAZIONI

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

AREA TERAPEUTICA

Patologie dell'invecchiamento



BREVE DESCRIZIONE

L'inflammasoma NLRP3 (NOD-, LRR- and pyrin domain-containing protein 3) è un complesso multiproteico citosolico delle cellule del sistema immunitario innato e media la risposta infiammatoria verso una pletera di stimoli di varia natura, derivanti da agenti patogeni o da danni molecolari. Un'iperattivazione di NLRP3 è stata associata ad uno stato di infiammazione cronica ed è stata riscontrata in una serie di condizioni patologiche legate all'invecchiamento, quali le malattie neurodegenerative, cardiovascolari, autoimmuni e del metabolismo. NLRP3 è pertanto un target validato e attraente ai fini della scoperta di nuovi farmaci antiinfiammatori. Ad oggi, MCC950 è il candidato lead per eccellenza (IC₅₀ di 8 nM) ma non ha superato gli studi di fase clinica

per via della sua tossicità epatica e renale. Questo inibitore sembra legare il bersaglio in maniera non covalente e non competitiva, in una regione prossimale al Walker B all'interno del dominio NACHT. Guidati dalle evidenze in letteratura (pdb 7ALV), abbiamo deciso di progettare e sintetizzare nuovi chemotipi, mantenendo le proprietà elettroniche del composto lead ma disegnando strutture molto diverse, allo scopo di identificare potenziali inibitori innovativi del macchinario NLRP3. In particolare, sono stati disegnati cinque chemotipi, per ognuno dei quali è stata progettata una via sintetica che fosse fattibile ed economica sia in termini di dispendio economico che di tempo.

A destra:
Possibili meccanismi di attivazione dell'Inflammasoma NLRP3.

IMPATTO

Il progetto si inserisce in un contesto altamente competitivo e volto alla scoperta di nuovi farmaci in grado di curare l'infiammazione cronica, e cioè il quadro clinico associato alle malattie dell'invecchiamento. Attualmente, non sono disponibili sul mercato farmaci chimici in grado di inibire NLRP3. Per il trattamento terapeutico, infatti, si ricorre ad anticorpi monoclonali (Anakinra, Canakinumab, Rilonacept), il cui utilizzo è legato ad una serie di limitazioni, quali i costi elevati, la scarsa compliance del paziente, la brevissima emivita plasmatica (è richiesta un'iniezione giornaliera); la tossicità legata alla soppressione del sistema immunitario e quindi all'aumentato rischio di contrarre infezioni; e la scarsa penetrazione della barriera emato-encefalica. La scoperta di farmaci di tipo *small molecule* in grado di inibire NLRP3 è l'obiettivo di numerose aziende farmaceutiche e rappresenta senz'altro una svolta per ovviare agli svantaggi sopra indicati, e a migliorare la qualità della vita dei pazienti. Un punto di forza del progetto è la presenza all'interno della Fondazione Ri.MED di un'area di Drug Discovery che mette insieme competenze molto diverse ma interconnesse e necessarie per sviluppare le fasi iniziali della *early discovery*, e quindi l'identificazione di nuovi hits, l'ottimizzazione strutturale di quelli più promettenti, fino alla identificazione di un lead che possa essere oggetto di studi preclinici.

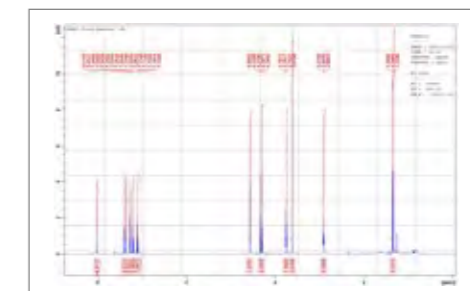
RISULTATI RAGGIUNTI NEL 2021

Durante l'anno 2021, e in particolare a partire da metà Aprile, data ufficiale di inizio delle attività di sintesi del laboratorio di Chimica Medicinale, ci siamo concentrati sullo studio e ottimizzazione della via sintetica di quattro chemotipi: i) le tetraidro-carboline; ii) i 3-sulfonilindoli, iii) le sulfonamidi α,β-insature, iv) le tiazinoazepine. Lo studio delle vie sintetiche ha previsto, per ogni step, una valutazione della reattività degli intermedi di sintesi e delle condizioni migliori di reazione, al fine di ottenere il prodotto atteso con le rese più alte e utilizzando il più possibile condizioni green. Per ogni step è stato eseguito uno studio di fattibilità di scale-up. Per ciascun intermedio di reazione è stata eseguita la caratterizzazione analitica completa attraverso tecniche di spettroscopia NMR (¹H e ¹³C) e spettrometria di massa. I composti finali, da valutare biologicamente nel saggio primario *in vitro*, sono stati purificati in HPLC e ottenuti con un grado di purezza superiore al 96%.

Ad oggi, per le (i) tetraidrocarboline la via sintetica è stata ottimizzata per intero. Non appena disporremo di un numero rappresentativo di campioni per questo chemotipo li studieremo dal punto di vista del profilo biologico nel saggio primario sviluppato dal gruppo di HTS della Fondazione.

OBIETTIVI PER IL 2022

Durante il prossimo anno, miriamo a ultimare l'ottimizzazione della via sintetica degli altri chemotipi. Il primo goal è quello di sintetizzare una mini serie di composti rappresentativi di ciascun chemotipo, che verranno testati *in vitro*. I risultati dello screening biologico saranno fondamentali per l'identificazione di potenziali hits. Seguirà il disegno razionale di analoghi per l'arricchimento delle serie e l'ottimizzazione strutturale delle molecole promettenti. Attraverso uno studio approfondito delle relazioni struttura-attività (SAR) esploreremo lo spazio chimico dei composti biologicamente interessanti. In collaborazione con il gruppo di Molecular Informatics, impareremo a conoscere il *binding mode* dei nuovi chemotipi all'interno del sito NACHT del target NLRP3. La progettazione razionale sarà accompagnata di pari passo dall'attività di sintesi delle molecole e dallo screening biologico delle stesse, che darà indicazioni sul successo o sul fallimento delle manipolazioni chimiche. Il goal ultimo è di identificare composti con un profilo farmacocinetico definito in termini di potenza ed efficacia. Saggi biologici secondari e ortogonali sviluppati dal gruppo di HTS ci aiuteranno a meglio definire eventuali problemi di aspecificità o selettività dei composti di nuova sintesi e ad implementare le informazioni derivanti dall'utilizzo di un saggio primario indiretto di tipo cellulare.



Spettro del protone monodimensionale (¹H NMR) di un campione finale di laboratorio

CONFERENZE

Gli Inflammasomi: La frontiera futura, Settembre, 2021, Martinsried (Germania) – (online Embo workshop)

PUBBLICAZIONI

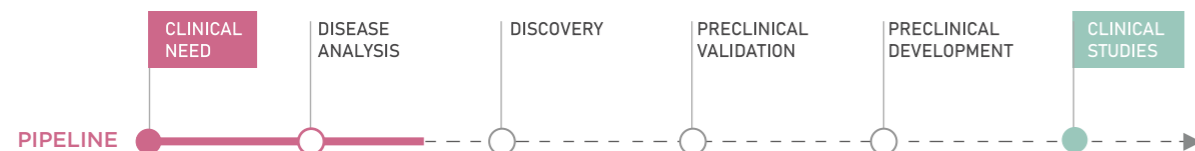
- Mekni, N.; Coronello, C.; Langer, T.; De Rosa, M.; Perricone, U. (2021). Support Vector Machine as a Supervised Learning for the Prioritization of Novel Potential SARS-CoV-2 Main Protease Inhibitors. *Int. J. Mol. Sci.*, 22, 7714 (1-20). doi.org/10.3390
- Sharma, A.; De Rosa, M.; Singla, N.; Singh, G.; Barnwal, R. P.; Pandey, A. (2021). Tuberculosis: An Overview of the Immunogenic Response, Disease Progression, and Medicinal Chemistry Efforts in the Last Decade toward the Development of Potential Drugs for Extensively Drug-Resistant Tuberculosis Strains. *J. Med. Chem.* 64(8), 4359–4395. doi.org/10.1021/acs.jmedchem.0c01833

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 - Neuroscienze



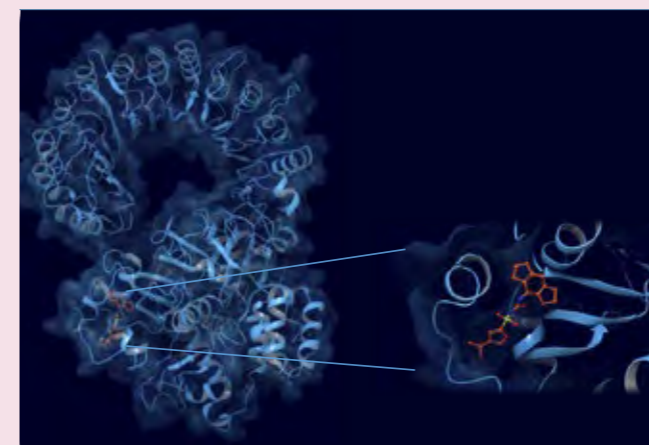
BREVE DESCRIZIONE

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 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



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

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

RISULTATI RAGGIUNTI NEL 2021

Nel 2021, il gruppo di Molecular Informatics ha integrato diversi approcci di biologia strutturale computazionale al fine di creare un modello 3D intero della proteina NLRP3 da poter utilizzare per le campagne di *virtual screening* e per il disegno razionale di modulatori in collaborazione con il gruppo di chimica medicinale. In particolare, partendo dal modello di cryoEM della proteina come stampo, è stato impiegato un approccio ab initio per inserire le parti mancanti del NACHT domain attraverso *threading* e di allineamento multiplo per inserire la porzione del PYD domain disponibile come struttura risolta ai raggi X. Il modello così completato è stato sottoposto a diversi protocolli di minimizzazione energetica e a studi di *docking* molecolare con inibitori noti. Questo processo ha permesso di creare un modello da poter essere utilizzato per le campagne di *virtual screening* e di *rational design*. La razionalizzazione del *binding* di molecole attive è stato infatti il primo passaggio per assicurarsi che il modello fosse in grado di riprodurre le pose sperimentali degli inibitori noti. Durante il 2021 sono stati inoltre testati gli analoghi di due *hit compound* provenienti dalla campagna di screening biologico precedente, ma che, hanno dato dei problemi di tipo qualitativo. Tali molecole provengono dalla progettazione di inibitori proteina-proteina che agirebbero sul dominio PYD di NLRP3.

OBIETTIVI PER IL 2022

Nel 2022 l'obiettivo sarà quello di effettuare i saggi biologici su 1000 molecole acquisite nel 2021 da campagne di *virtual screening* e trovare due *hit families* con chemotipi brevettabili. A tal fine, il gruppo di molecular informatics, lavorerà a fianco del gruppo di chimica medicinale per la progettazione razionale di nuove molecole di sintesi e per la razionalizzazione del *binding mode* delle molecole proposte dalla chimica sintetica. Il lavoro pregresso fatto sul modello computazionale di proteina permetterà infatti di razionalizzare i diversi chemotipi che potenzialmente legheranno il NACHT domain della proteina. Allo stesso tempo, il gruppo continuerà lo studio degli inibitori proteina-proteina (PYD-PYD) ampliando la serie di analoghi dei due *preliminary actives* riscontrati negli screening precedenti.

PRODOTTI: **Farmaci**

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

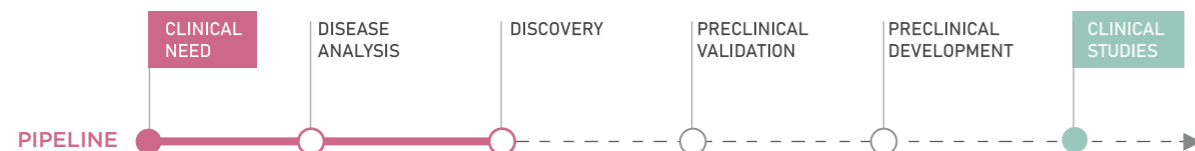
Ugo Perricone, PhD
uperricone@fondazionerimed.com

COLLABORAZIONI

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

AREA TERAPEUTICA

Oncologia



BREVE DESCRIZIONE

I processi epigenetici sono meccanismi essenziali nel funzionamento fisiologico dei modelli di espressione genica cellulare. 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.

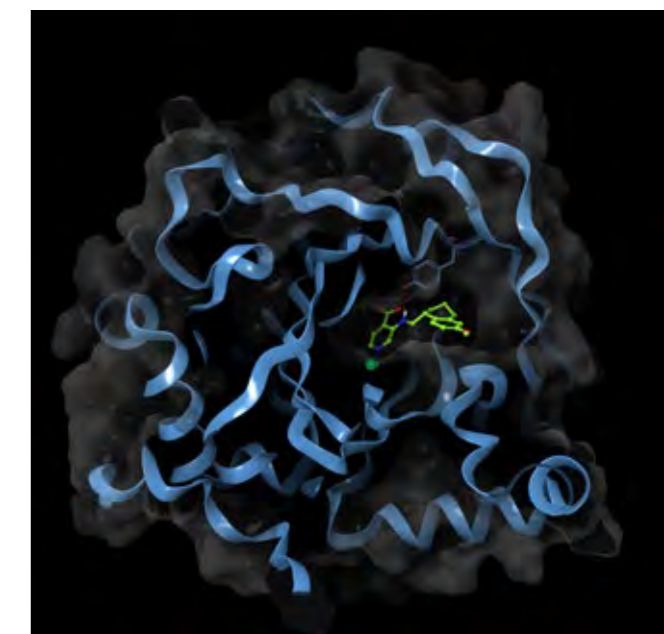
RISULTATI RAGGIUNTI NEL 2021

Durante il 2021 sono stati creati modelli computazionali ibridi (*structure- and ligand-based*) in grado di effettuare *virtual screening* massivi su librerie commerciali, prioritizzando chemotipi con spazio di patentabilità. In particolare ci si è concentrati sull'utilizzo di algoritmi di *docking* molecolare, farmacofori *structure- and ligand-based* e approcci chemoinformatici basati sull'utilizzo di *fingerprint* molecolari. Sono stati inoltre utilizzati i dati di attività degli screening biologici precedenti per impostare constraints strutturali ai modelli utilizzati per il *virtual screening*. Gli approcci utilizzati sono stati combinati in una funzione di *scoring* di tipo consensus che ha permesso di ottimizzare la selezione di mole-

cole riconosciute come potenziali attivi con approcci complementari. Da questa campagna di *virtual screening* sono state selezionate 350 molecole che verranno testate durante il 2022 con saggio biochimico sulla proteina KDM4a. I modelli computazionali sono stati inoltre utilizzati per il design razionale di molecole progettate in house. Insieme al gruppo di chimica medicinale, sono stati infatti teorizzati i *binding mode* delle serie progettate dal gruppo di chimica medicinale.

OBIETTIVI PER IL 2022

Per il 2022 l'obiettivo principale è lo screening delle molecole selezionate dal *virtual screening* al fine di trovare *hit compound* da utilizzare quale punto di partenza per la progettazione e la sintesi di molecole analoghe delle hit preliminari al fine di migliorarne la potenza e il profilo di tossicità. I modelli computazionali verranno inoltre utilizzati per razionalizzare i risultati trovati per le molecole di nuova sintesi. Gli approcci di *Machine learning* ultimamente sviluppati presso il gruppo di molecular informatics, verranno impiegati per valutare la selettività verso altre demetilasi dei composti progettati. Questo approccio sarà utile nel processo di valutazione SAR e nel guidare l'ottimizzazione strutturale delle molecole nella fase di *hit to lead*.



Un inibitore in azione all'interno del sito attivo di KDM4.

iRhom2: un nuovo target terapeutico in osteoartrosi

Simone Dario Scilabra, PhD
sdscilabra@fondazi



COLLABORAZIONI

- Institute of Aging and Chronic Diseases, University of Liverpool, Regno Unito
- Pharmacy Department, Università di Pisa, Pisa, Italia
- German Center for Neurodegenerative Diseases (DZNE), Monaco, Germania



AREA TERAPEUTICA

Patologie dell'invecchiamento



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 ADAMTS. 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.

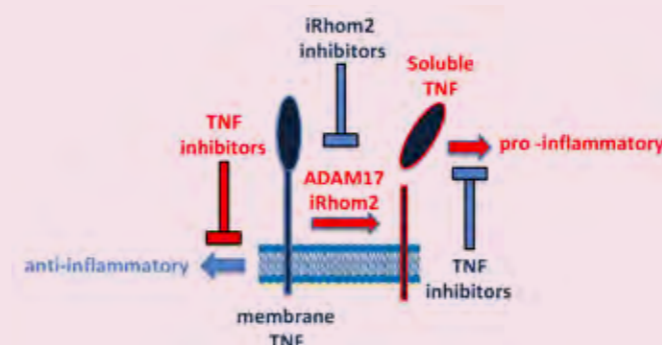
IMPATTO

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 2021

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 mostrano delle differenze nello sviluppo dell'osso e della cartilagine nei topi iRhom2 KO. Gli esperimenti basati sul modello murino di osteoartrosi saranno eseguiti a breve. Un dottorando, Simone Bonelli, sta utilizzando metodi di proteomica quantitativa per spiegare meccanicamente queste differenze nello sviluppo delle articolazioni evidenziate dagli studi *in vivo* preliminari. Inoltre, sta



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 2022

Il 2022 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 terapeutico.



PUBBLICAZIONI

- Spanò D. P. and Scilabra S. D.; Tissue inhibitor of metalloproteases 3 (TIMP-3): *in vivo* analysis underpins its role as a master regulator of ectodomain shedding, *Membranes*, *in press*.
- 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; PMCID: PMC7916773.
- Yamamoto K, de Groot R, Scilabra SD, Kwok HF, Santamaria S. Editorial: ADAM, ADAMTS and Astacin Proteases: Challenges and Breakthroughs in the -Omics Era. *Front Mol Biosci*. 2021 Oct 12;8:780242. doi: 10.3389/fmolb.2021.780242. PMID: 34712699; PMCID: PMC8546316.
- Carreca AP, Pravatà VM, D'Apolito D, Bonelli S, Calligaris M, Monaco E, Müller SA, Lichtenthaler SF, Scilabra SD. Quantitative Proteomics Reveals Changes Induced by TIMP-3 on Cell Membrane Composition and Novel Metalloprotease Substrates. *Int J Mol Sci*. 2021 Feb 27;22(5):2392. doi: 10.3390/ijms22052392. PMID: 33673623; PMCID: PMC7957584.

iRhom2 regola il rilascio delle molecole MHC di classe I

Simone Dario Scilabra, PhD
sdscilabra@fondazionerimed



COLLABORAZIONI

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



AREA TERAPEUTICA

- Oncologia
- Malattie infettive



BREVE DESCRIZIONE

Il rilascio proteolitico di proteine transmembrana, il cosiddetto *ectodomain shedding*, è una modifica post-traduzionale che gioca un ruolo cruciale nella comunicazione cellulare e in altri processi biologici. Il termine "sheddasì" si riferisce alle proteasi ancorate alla membrana che effettuano lo "shedding" proteolitico. Tra queste, ADAM17 è la più investigata per il suo ruolo fondamentale nell'immunità. Infatti, ADAM17 venne identificata circa 30 anni fa come l'enzima responsabile per il rilascio del fattore di necrosi tumorale (TNF), una citochina pro-infiammatoria associata all'insorgenza di malattie autoimmuni come l'artrite o il morbo di Crohn. Da allora si è scoperto che ADAM17 rilascia oltre 80 proteine, regolando in questa maniera numerosi processi biologici, non solo nel sistema immunitario ma anche in altri tessuti. Per esempio, recentemente si è scoperto che ADAM17

processa l'enzima di conversione dell'angiotensina-2 (ACE2), che è anche il recettore per l'entrata del SARS-CoV-2, o TREM2, il più importante fattore di rischio genetico associato alla malattia di Alzheimer. È chiaro che identificare nuovi substrati di ADAM17 permetterebbe la scoperta di nuove funzioni di questo enzima, e potenzialmente nuovi target terapeutici. Per fare ciò, abbiamo messo a punto un nuovo metodo di proteomica quantitativa, *secretome analysis of heparin-treated cells* (Hep-sec) che permette l'identificazione di tutti quei substrati di ADAM17 che vengono internalizzati velocemente dopo lo *shedding* o che vengono sequestrati dalla matrice extracellulare. Questa procedura ci ha permesso di identificare le molecole del complesso maggiore di istocompatibilità di classe I (MHC-I) come un nuovo substrato di ADAM17. MHC-I hanno un ruolo cruciale nella rispo-

IMPATTO

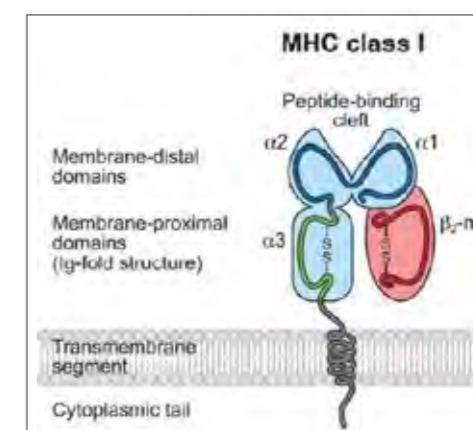
iRhom2 è un regolatore essenziale di ADAM17, una proteasi che, per la sua capacità di convertire il TNF da "proteina di membrana" a citochina solubile, gioca un ruolo chiave nelle risposte immunitarie. I nostri risultati mostrano che, oltre al TNF, iRhom2 regola lo *shedding* delle molecole MHC di classe I, proteine fondamentali nelle risposte immunitarie in quanto capaci di esporre gli antigeni peptidici per il riconoscimento e l'attivazione delle cellule immunitarie. È chiaro, quindi, come questa ricerca possa contribuire a incrementare la conoscenza scientifica sui meccanismi molecolari dell'immunità e, potenzialmente, sviluppare trattamenti terapeutici per malattie virali e tumori. Inoltre, la metodologia proteomica che abbiamo sviluppato per identificare MHC-I come substrato di ADAM17, potrebbe essere utilizzata per l'analisi proteomica di fattori di crescita, chemochine e altre proteine che solitamente legano la matrice extracellulare, e quindi non sono facili da identificare nel mezzo condizionato di cellule in coltura.

RISULTATI RAGGIUNTI NEL 2021

Nel 2021 abbiamo caratterizzato il ruolo di iRhom2 nel meccanismo di *shedding* delle MHC di classe I, anche grazie alle collaborazioni che abbiamo messo in piedi con Prof Carl Blobel (Weill Cornell University, New York, USA) e Prof. Stefan Lichtenthaler (DZNE Munich, Germany) 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. Nello specifico, abbiamo dimostrato mediante tecniche di proteomica e di biologia molecolare che iRhom2 regola lo *shedding* ADAM17-dipendente di MHC di classe I in vari tipi cellulari, compreso fibroblasti, macrofagi murini e umani. Oltre a MHC-I, la metodologia proteomica che abbiamo sviluppato, chiamata Hep-sec, ci ha permesso di identificare altri substrati di ADAM17 che saranno studiati più in dettaglio successivamente.

OBIETTIVI PER IL 2022

Nel 2022 prevediamo di pubblicare i risultati raggiunti su questo progetto e presentarli a conferenze internazionali. Inoltre, inizieremo a studiare le conseguenze funzionali di questo meccanismo di regolazione in processi biologici in cui la presentazione di antigeni sulle MHC di classe I gioca un ruolo chiave, come la risposta immunitaria a virus e tumori. Alcuni dei substrati di ADAM17 che abbiamo identificato mediante Hep-sec possono avere conseguenze patofisiologiche importanti in processi come immunità a tumori e entrata dei virus artritogenici. Nel 2022 saranno poste le basi per studiare questi processi in dettaglio, ovvero reperire i reagenti e predisporre le necessarie collaborazioni per studiare questi meccanismi molecolari e le conseguenze funzionali *in vivo* della regolazione mediata da ADAM17.



Schematic representation of a MHC class I molecule

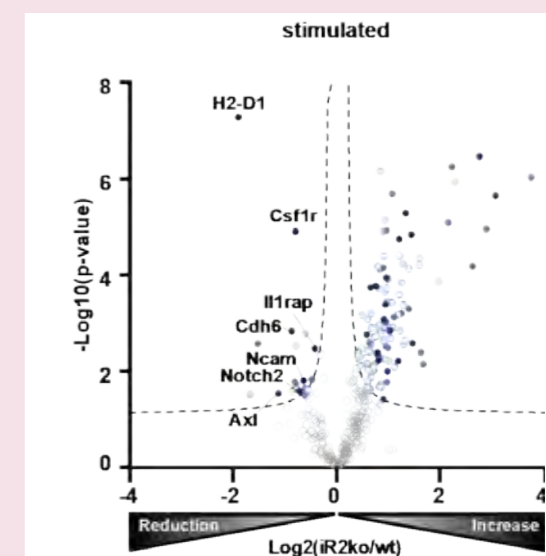


PUBBLICAZIONI

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

sta immunitaria ai virus e nella progressione tumorale, in quanto presentano gli antigeni virali e tumorali ai linfociti T citotossici e alle cellule natural killers (NKs). Inoltre, abbiamo scoperto che il regolatore di ADAM17 conosciuto come iRhom2, oltre a supportare la maturazione e l'attività dell'enzima, è coinvolto nella regolazione dei livelli di MHC di classe I. L'ablazione genetica di iRhom2 in macrofagi e fibroblasti murini rende queste cellule incapaci di rilasciare MHC I nel mezzo condizionato. Studiare le conseguenze funzionali di questo meccanismo di regolazione è il maggiore obiettivo per il 2022.

Figura a destra: Volcano plot showing the $-\log_{10}$ of p-values versus the \log_2 of protein ratio between iRhom2 KO and wild-type bone marrow derived macrophages of 512 proteins (n=6). Proteins above the two dashed hyperbolas are considered significantly regulated (blue dots for transmembrane proteins, light blue dots for secreted proteins). H2-D1, one of the murine MHC-I allotypes, is the most reduced protein in the secretome of iRhom2 KO macrophages.



PRODOTTI: **Biomarcatori - Farmaci chimici e biologici**

Ruolo di iRhom2 nella regolazione dei livelli delle molecole del complesso maggiore di istocompatibilità di classe I e nella risposta dell'adenocarcinoma pancreatico all'immunoterapia

Simone Dario Scilabra, PhD
sdscilabra@fondazionerimed.com



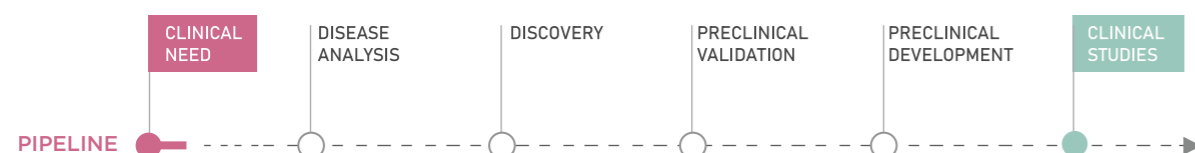
COLLABORAZIONI

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



AREA TERAPEUTICA

- Oncologia
- Malattie infettive



BREVE DESCRIZIONE

L'adenocarcinoma pancreatico è uno dei tumori più aggressivi e caratterizzato da una prognosi infausta, anche a causa della mancanza di risposta all'immunoterapia. Una delle cause principali per l'assenza di risposta alla terapia immunoterapica sono i bassi livelli di espressione delle molecole del complesso maggiore di istocompatibilità di classe I. Di conseguenza, terapie in grado di aumentare tali livelli sono necessarie per sviluppare una cura per questa tipologia di tumori.

iRhom2 è una proteina associata al reticolo endoplasmico che svolge un ruolo chiave nel *pathway* del TNFα e dell'IFN-γ. Infatti, iRhom2

media il traffico e l'attivazione della TNFα-convertasi e dello stimolatore del gene dell'interferone (STING). L'attivazione di STING induce l'espressione delle MHC-I, quindi ipotizziamo che iRhom2 possa aumentare i livelli di superficie cellulare MHC-I nelle cellule PDAC, svolgendo così un ruolo benefico nel migliorare la risposta del PDAC all'immunoterapia. L'obiettivo principale di questo progetto è analizzare il ruolo di iRhom2 nella modulazione delle MHC-I nel contesto del PDAC e della risposta di questo tumore all'immunoterapia.

IMPATTO

Questo progetto si propone di studiare il ruolo di iRhom2 nel PDAC e il suo potenziale coinvolgimento nella regolazione dei livelli di MHC-I in questo tumore. Il raggiungimento dei suoi obiettivi mediante l'utilizzo di tecniche innovative in proteomica, come hiSPECS e suSPECS, e le collaborazioni consolidate tra la Fondazione Ri.MED, l'Università di Palermo e il DZNE di Monaco di Baviera (Germania), possono avere un impatto molto positivo sia in campo scientifico, sia sulla società. Infatti, questo progetto multidisciplinare può tradursi in benefici clinici per i pazienti con PDAC, la cui prognosi è al momento infausta. Inoltre, in seguito all'esito positivo del progetto proposto, approcci proteomici simili potrebbero essere utilizzati per identificare biomarcatori che possono essere utili per il trattamento di altri tipi di tumori, tra cui il cancro del colon e del polmone.



RISULTATI RAGGIUNTI NEL 2021

Donatella Pia Spanò ha recentemente vinto una borsa di dottorato innovativo e porterà avanti la parte sperimentale di questo progetto di ricerca, che è appena iniziato. Nel 2021 sono stati reperiti i reagenti e sono state avviate tutte le collaborazioni necessarie per realizzare gli obiettivi del progetto. Tra queste una collaborazione con l'Università degli Studi di Palermo che ci ha fornito delle linee cellulari di PDAC e collaborerà alla generazione delle linee cellulari di PDAC che esprimono livelli differenziali di iRhom2.



OBIETTIVI PER IL 2022

Nel 2022 prevediamo di pubblicare i risultati raggiunti su questo progetto e presentarli a conferenze internazionali. Inoltre, inizieremo a studiare le conseguenze funzionali di questo meccanismo di regolazione in processi biologici in cui la presentazione di antigeni sulle MHC di classe I gioca un ruolo chiave, come la risposta immunitaria a virus e tumori.



CONFERENZE

Spanò D. P. and Scilabra S. D.; Tissue inhibitor of metalloproteases 3 (TIMP-3): in vivo analysis underpins its role as a master regulator of ectodomain shedding, Membranes, in press.



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



PRODOTTI: Piattaforma digitale per l'aggregazione e l'analisi di Data set

OBIND – Oncological therapies through Biological Interaction Network Discovery

Claudia Coronello, PhD
ccoronello@fondazionerimed.com

Ugo Perricone, PhD
uperricone@fondazionerimed.com



COLLABORAZIONI

- Capo fila: Exprivia SPA, Carini (PA), Italia
- Università Degli Studi di Palermo, Italia
 - Dipartimento di Scienze Economiche, Aziendali e Statistiche (SEAS)
 - Dipartimento di Innovazione Industriale e Digitale (DIID)
 - Dipartimento di Scienze e Tecnologie Biologiche Chimiche e Farmaceutiche (STEBICEF)
- Consiglio Nazionale delle Ricerche, Istituto per la Ricerca e l'Innovazione Biomedica (IRIB), Palermo, Italia
- SecurProject SRL, Palermo, Italia
- 2038 Innovation Company, Palermo, Italia
- Os2 SRL, Palermo, Italia

AREA TERAPEUTICA

Oncologia

IMPATTO

La piattaforma OBIND rappresenterà un hub a cui potranno accedere ricercatori della comunità medico-scientifica, aziende, contributor del settore fornitori di dati utili ai risultati e indicazioni raggiunte. Alto valore è dato dalla possibilità per la comunità medico-scientifica di ottenere una visione olistica del processo oncogenico, rivelando interazioni tra molecole biologiche che possono aprire le porte a nuove applicazioni in campo terapeutico. Il sistema sarà rivolto all'analisi delle interazioni biologiche coinvolte nell'insorgenza di un tumore, con un focus sulle interazioni tra proteine, RNA e piccole molecole, valorizzando la presenza nel web di numerosi data set utilizzabili per tali analisi. Uno dei punti di forza della piattaforma è rappresentato dalla validazione dei dati biologici con metodologie *in vitro* che contribuiranno a migliorare ulteriormente la capacità predittiva degli algoritmi utilizzati all'interno della stessa. Tramite accesso personalizzato alla piattaforma sarà possibile consultare le *repository* d'interesse (dati, risultati ottenuti integrando e processando le informazioni raccolte, suggerimenti per ulteriori raccolte di dati finalizzate ad ottimizzazione delle soluzioni già individuate o all'individuazione di nuove soluzioni), da un punto qualsiasi della rete Internet attraverso moderne webGUI, attraverso le app per smartphone e tablet predisposte nell'ambito del progetto, attraverso interfacce aperte che aprono l'accesso ad altri sistemi.

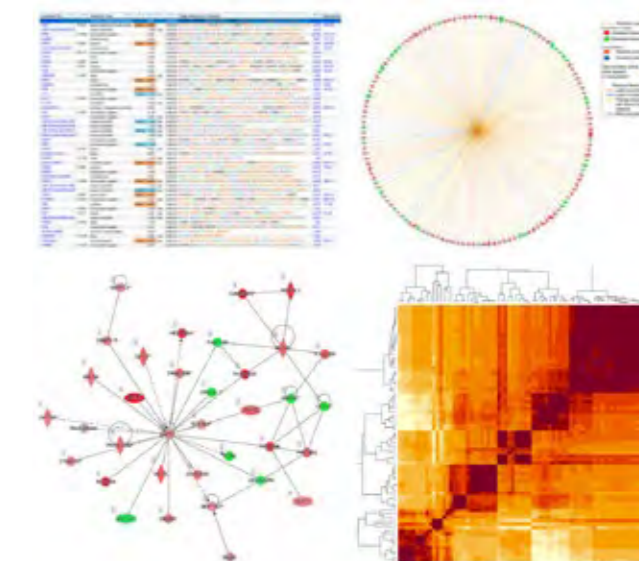
RISULTATI RAGGIUNTI NEL 2021

Nel 2021 è stata ultimata l'infrastruttura di back-end della piattaforma, creando la *repository* dei dati e le connessioni tra i vari DB che alimentano la piattaforma. Inoltre, da un punto di vista chemoinformatico sono stati ottimizzati sia i sistemi di studio delle interazioni proteina-proteina che la creazione di modelli basati su machine intelligence per la predizione di affinità tra *small molecules* e target tera-

peutici in campo oncologico (eg. Famiglia delle Kinasi). Per quanto riguarda la raccolta dati a supporto della componente bioinformatica della piattaforma, è stato completato il pannello di esperimenti volti a caratterizzare i profili di espressione genica di due linee cellulari di carcinoma mammario (MCF7 e MDA). In particolare, sono state studiate due proteine del complesso RISC (AGO2 e GW172), analizzando i profili di espressione genica ottenuti in seguito alla loro inibizione e/o immunoprecipitazione. Tali dati saranno utilizzati per la realizzazione di nuovi algoritmi per la predizione di target di microRNA

OBIETTIVI PER IL 2022

Il 2022 prevede la chiusura del finanziamento regionale (PO FESR, Azione 1.1.5) ottenuto per il progetto OBIND. Entro la fine del 2022 verrà rilasciata la piattaforma consultabile on line da parte degli utenti. In particolare, si procederà con una fase di test di una versione beta consultabile internamente dai partner di progetto per validare tutte le componenti per poter poi rendere fruibile la piattaforma all'esterno. Nella fase di test si procederà a valutare sia la parte di consultazione integrata dei database pubblici che la parte di algoritmi predittivi integrati. Obiettivo per il 2022 è anche quello di promuovere la piattaforma attraverso social media e partecipazione a conferenze nazionali e internazionali. La promozione del progetto è già iniziata attraverso il sito internet disponibile on line all'indirizzo: <https://obind.os2service.com/il-progetto/>.



PUBBLICAZIONI

- Gulotta M.R., De Simone G., John J., Perricone U., Brancale A., (2021) A Computer-Based Methodology to Design Non-Standard Peptides Potentially Able to Prevent HOX-PBX1-Associated Cancer Diseases, *Int. J. Mol. Sci.*, 22(11), 5670 doi: 10.3390/ijms22115670
- Gulotta M.R., Vittorio S., Gitto R., Perricone U., De Luca L., (2021), Exploring molecular contacts of MUC1 at CIN85 binding interface to address future drug design efforts, *Int. J. Mol. Sci.*, 22(4), 2208, doi: 10.3390/ijms22042208



Il Progetto n. 086202000366 – "OBIND", CUP G29J18000700007 è stato cofinanziato dalla Regione Siciliana, Assessorato delle Attività Produttive nell'ambito dell'Azione 1.1.5 "Sostegno all'avanzamento tecnologico delle imprese attraverso il finanziamento di linee pilota e azioni di validazione precoce dei prodotti e di dimostrazione su larga scala" del PO FESR Sicilia 2014/2020

BREVE DESCRIZIONE

Lo studio delle patologie complesse, come quelle tumorali, necessita un approccio di analisi dati integrato. Lo sviluppo della patologia tumorale, infatti, passa attraverso la regolazione di *pathways* che coinvolgono un elevato numero di molecole biologiche. Ad oggi, più di 500 geni sono stati identificati come fortemente implicati nel processo di trasformazione delle cellule normali in cellule tumorali. Il progetto OBIND nasce con lo scopo di realizzare un sistema informatizzato in campo oncologico che consenta una rapida ed efficace aggregazione e successiva analisi di data set eterogenei.

Le informazioni aggregate vengono sfruttate come base di partenza per lo studio delle interazioni tra diverse molecole biologi-

che, che risultano alterate nelle patologie tumorali al fine di creare un disegno razionale nella progettazione di nuove terapie. Ad oggi non esiste uno strumento informatico che integri le informazioni disponibili relative a tali discipline, nonostante gli argomenti siano strettamente interlacciati. La raccolta e l'analisi dei dati descritti in un unico ambiente, faciliterebbe la progettazione di terapie altamente specializzate e personalizzate. L'obiettivo principale del progetto è pertanto la creazione di un sistema esperto per la valorizzazione e l'integrazione di dati già in possesso dei partner, di dati provenienti da database di pubblico dominio, e di dati che verranno prodotti durante le fasi di progetto attraverso algoritmi di predizione proprietari.



MEDICINA RIGENERATIVA E IMMUNOTERAPIA

I laboratori di medicina rigenerativa e immunoterapia si trovano all'interno dell'IRCCS ISMETT e sono focalizzati sullo sviluppo di nuove terapie cellulari per malattie terminali d'organo e complicazioni post-trapianto. 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.

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. 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.

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.

Grazie al progetto "Infrastruttura di Ricerca (IR)", cofinanziato dalla Regione Siciliana tramite il PO FESR Sicilia 2014-2020, nel corso del 2021 sono stati potenziati i laboratori di ricerca, di produzione cellulare e diagnostici del cluster Ri.MED-ISMETT, attraverso lavori di ammodernamento e acquisizione di attrezzature e strumenti all'avanguardia.

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

Secretoma di cellule mesenchimali stromali umane nel trattamento di ferite cutanee croniche: soluzioni di rilascio a base di biomateriali

Cinzia Chinnici, PhD

Creazione di banche di cellule staminali pluripotenti indotte (iPSCs) *patient-specific*: modelli *in vitro* per terapia genica e drug discovery

Cinzia Chinnici, PhD

Ottimizzazione di una terapia anti-fibrotica per fegato a base di vescicole extracellulari (EVs) e microRNAs: soluzioni di rilascio a base di biomateriali

Cinzia Chinnici, PhD

Il cordone ombelicale umano nell'ambito del progetto PROMETEO: da tessuto scartato a possibile fonte di cura

Simona Corrao, PhD

Sviluppo e caratterizzazione di un dotto biliare bioingegnerizzato

Maria Giovanna Francipane, PhD Mattia Pasqua, PhD

Sviluppo di un modello di osteoartrite *ex vivo* sensibile ad inibitori di mTORC1 attraverso la riduzione dello stress ossidativo e la promozione di meccanismi autofagici

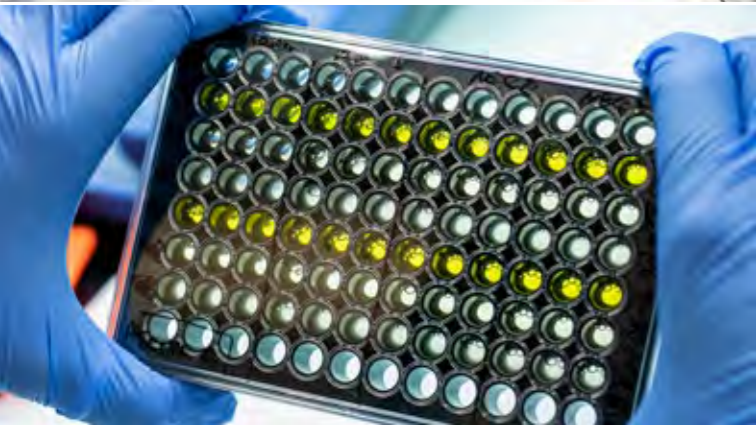
Riccardo Gottardi, PhD Roberto Di Gesù, PhD

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

Monica Miele, PhD

Cellule staminali mesenchimali per le malattie del fegato: sviluppo di una possibile terapia per prevenire la peritonite batterica spontanea in pazienti con cirrosi epatica

Mariangela Pampalone



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

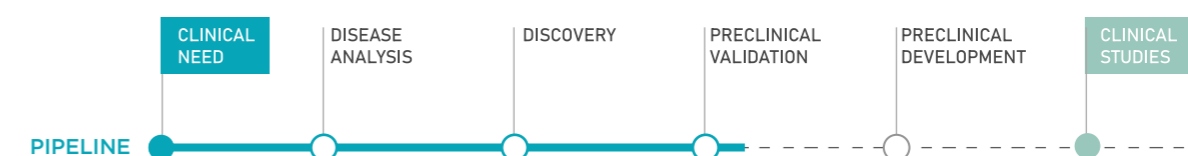
Ester Badami, PhD
ebadami@fondazionerimed.com

COLLABORAZIONI

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

AREA TERAPEUTICA

Oncologia



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 reseccabile. 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 under review - Cellular and Molecular Immunology - Nature Press) hanno dimostrato che la citochina interferon-alpha (IFN-α) significativamente aumenta l'attività anti-tumorale delle cellule NK. Il vettore da noi disegnato è un costrutto di quarta generazione che a valle del

L'ingegnerizzazione delle molecole CAR è stata maggiormente studiata nei linfociti 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 and 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 molecole 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 clinico.

RISULTATI RAGGIUNTI NEL 2021

Nel corso dell'anno 2021, è stato selezionato il protocollo di generazione delle cellule CAR-NK che ha consentito di ottenere la migliore efficienza di trasduzione. Infatti, siamo riusciti ad ottenere una efficienza di espressione della molecola CAR su cellule NK primarie superiore al 25% utilizzando trasfezione con vettori lentivirali. Per migliorare l'efficienza di trasduzione il vectofusing è stato aggiunto durante le fasi di trasfezione. Per aumentare la vitalità cellulare, abbiamo inoltre utilizzato la retronectin per il coating delle piastre di coltura delle NK cells, ottenendo una vitalità cellulare superiore all'80% (Fig 1). Infine, abbiamo appurato che l'efficienza di trasfezione del CAR utilizzando la nucleofezione, ovvero un processo *virus-free*, non ci permette di

CAR porta il segnale di attivazione transmembrana e le molecole di co-stimolazione citoplasmatica CD28 and 4-1BB. Inoltre, il vettore è stato disegnato in due varianti che differiscono per le citochine prodotte: nella prima viene sintetizzata solo la citochina IL15, che aumenta la vitalità delle cellule NK (CAR-IL15-NK). La seconda prevede che la cellula NK CAR+ esprima in aggiunta anche la citochina IFN- α , che aumenta notevolmente la citotossicità delle cellule NK (CAR-IL15-IFN α -NK). Infine, il vettore porta le informazioni per 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.

ottenere né una buona efficienza di trasfezione né in termini di vitalità cellulare, probabilmente perché il processo è troppo stressante per la cellula NK. Per testare la citotossicità e specificità delle cellule CAR-NK contro cellule che esprimono l'antigene tumorale target, le cellule CAR+ sono state isolate utilizzando uno strumento all'avanguardia che consente di ottenere cellule altamente pure (>95%) e vitali, ovvero il separatore cellulare MACSTyto (Miltenyi Biotec) (Fig. 2). Le cellule CAR+ esprimono anche alti livelli del gene suicida EGFR (Fig. 1). Per validare la specificità citotossica, le CAR-NK sono state testate in un saggio di citotossicità basato sul rilascio di cromo radioattivo (Chromium Release Assay), scegliendo come cellule tumorali target due linee cellulari esprimenti bassi e alti livelli dell'antigene tumorale selezionato (Tumor Associated Antigen - TAA), cioè le cellule K562 e Huh7.5, rispettivamente (Fig. 3). Come dimostrato in Figura 4, le cellule CAR-NK acquisiscono una maggiore citotossicità specifica nei confronti delle cellule target esprimenti l'antigene tumorale specifico per la molecola CAR rispetto alle target che ne esprimono a bassi livelli. I nostri dati preliminari dimostrano che le cellule NK esprimenti il CAR sono delle cellule effettrici più potenti rispetto alle CAR-negative.

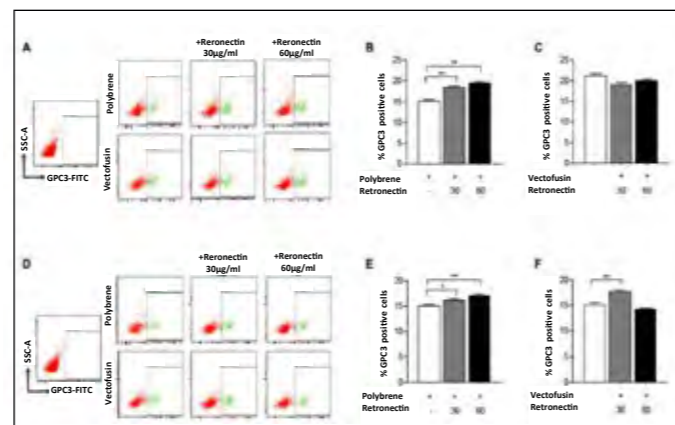


Fig.1 Trasduzione lentivirale delle cellule NK utilizzando Polybrene, Vectofusin and Retro-nectin. (A, D) Strategia di gating per valutare la efficienza di trasduzione delle cellule NK trasfettate con pseudoparticelle lentivirali per CAR-IL15 (A) e CAR-IFN α -IL15 (D). (B, E) Cellule NK di un donatore trasdotte con pseudoparticelle lentivirali per CAR-IL15 (B) e CAR-IFN α -IL15 (E) utilizzando polybrene da solo o combinato con la retronectin 30-60 μ g/ml e (C, F) con vectofusina da solo o combinato con la retronectin.

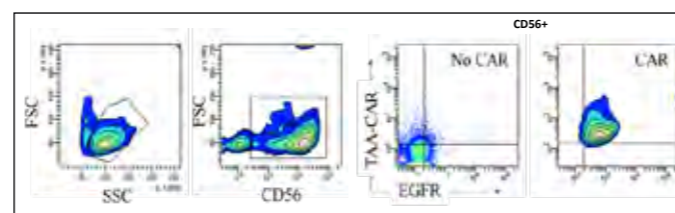


Fig.2 Isolamento delle cellule effettrici GPC3-CAR+EGFR+. Le cellule NK trasfettate sono state marcate con anticorpo anti-GPC3 e passate al sorter cellulare MACSTyto. L'efficienza di sorting è >95%.

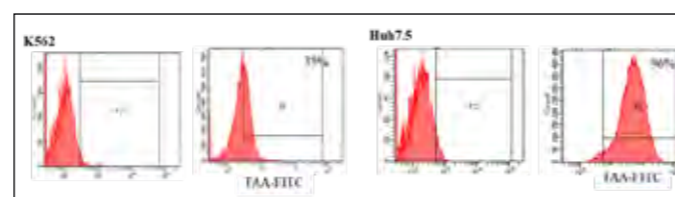


Fig.3 Citofluorimetria delle cellule target tumorali K562 (GPC3dim) e Huh7.5 (GPC3bright)

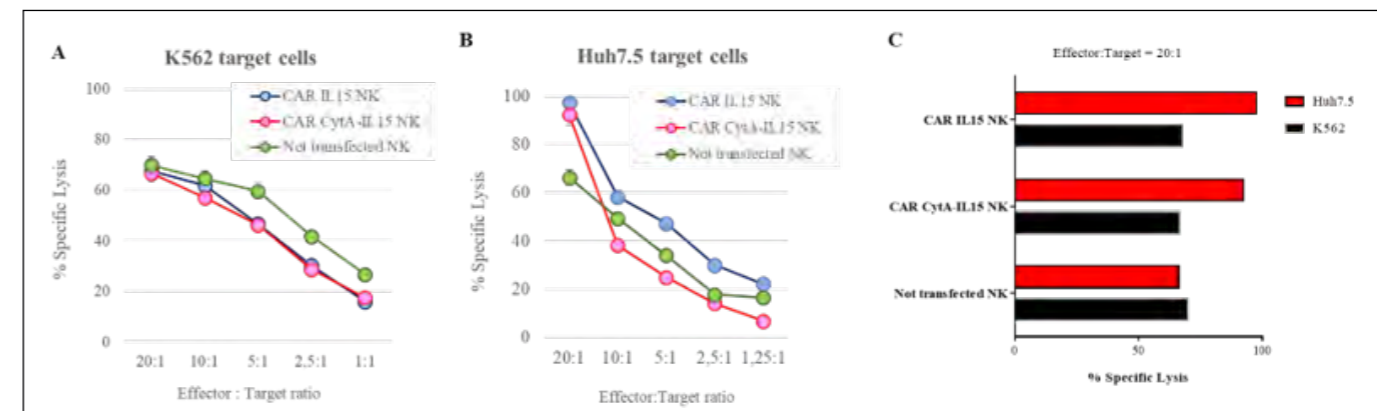


Fig.4 Trasduzione lentivirale delle cellule NK utilizzando Polybrene, Vectofusin and Retro-nectin. (A, D) Strategia di gating per valutare la efficienza di trasduzione delle cellule NK trasfettate con pseudoparticelle lentivirali per CAR-IL15 (A) e CAR-IFN α -IL15 (D). (B, E) Cellule NK di un donatore trasdotte con pseudoparticelle lentivirali per CAR-IL15 (B) e CAR-IFN α -IL15 (E) utilizzando polybrene da solo o combinato con la retronectin 30-60 μ g/ml e (C, F) con vectofusina da solo o combinato con la retronectin.

OBIETTIVI PER IL 2022

Testare l'efficienza *in vivo* delle cellule CAR-NK. 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*.

Ottimizzare ulteriormente il protocollo di trasduzione delle cellule CAR-NK per produzione su larga scala. I supernatanti lentivirali verranno concentrati e titolati adottando diverse metodologie quali: la precipitazione con agenti co-precipitanti, kit pronti all'uso, la concentrazione ad altissima velocità mediante ultra-centrifugazione. Questo ci permetterà di aumentare ulteriormente l'efficienza di trasduzione del vettore. Testeremo inoltre la capacità del gene suicida di indurre morte nella cellula NK attraverso fissazione del complemento sia *in vitro* che *in vivo*.

Testare l'efficienza di trasfezione direttamente *in vivo* utilizzando mRNA recapitato alla cellule NK *in vivo* tramite nanoparticelle lipidiche rivestite sulla superficie il CD56. Alternativamente alla trasfezione *ex vivo* seguita da reinfusione *in vivo* delle cellule CAR-NK, è stato recentemente dimostrato che è possibile effettuare terapia genica tramite trasferimento direttamente *in vivo* nel paziente inoculando nanoparticelle lipidiche contenenti l'RNA messaggero (mRNA) per il vettore CAR. Le particelle sono caratterizzate sulla superficie da recettori che vengono riconosciuti solo dalle cellule target (in questo caso le NK attraverso l'espressione del recettore specifico CD56), ed il mRNA viene recapitato solo a queste.

CONFERENZE

Annual Meeting of the International Society of Cell&Gene Therapy - ISCT 2021, VIRTUAL

PUBBLICAZIONI

- *Additive Effects of Type I Interferons and Galectin-9 on the Suppression of Hepatitis C Virus Infection by Interferon-alpha-activated Natural Killer Cells.* Anna Paola Carreca, Massimiliano Gaetani, Rosalia Busà, Maria Giovanna Francipane, Giovanna Russelli, Claudia Carcione, Pier Giulio Conaldi, Ester Badami
Under review - Cellular and Molecular Immunology (Nature press).
- *HCV Interplay with Mir34a: Implications in Hepatocellular Carcinoma* Ester Badami, Claudia Carcione, Cinzia Maria Chinnici, Rosaria Tinnirello, Pier Giulio Conaldi and Gioacchino Iannolo
Front. Oncol. - Gastrointestinal Cancers: Hepato Pancreatic Biliary Cancers. In Press.
- *A Radioactive-Free Method for the Thorough Analysis of the Kinetics of Cell Cytotoxicity.* Coronello C, Busà R, Cicero L, Comelli A, Badami E. *J Imaging.* 2021 Oct 23;7(11):222.
- *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 n. 16/464,823
Estensione brevetto: Europa; USA
A nome: RIMED, ISMETT
Titolo: NK-mediated immunotherapy and uses thereof
Inventor: Ester Badami

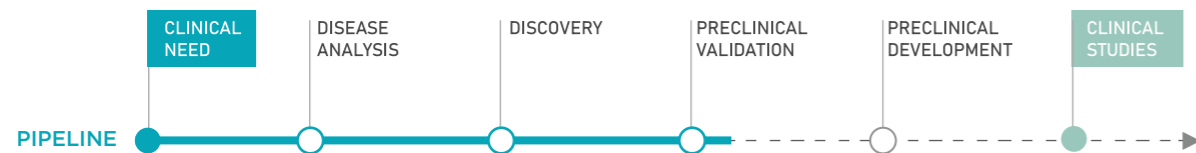
PRODOTTI: **ATMP** (Advanced Therapy Medicinal Products)

Cellule Dendritiche regolatorie nella prevenzione del rigetto di organo

Ester Badami, PhD
ebadami@fondazioneirimed.com

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

AREA TERAPEUTICA
Insufficienze d'organo



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 prodotto 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.

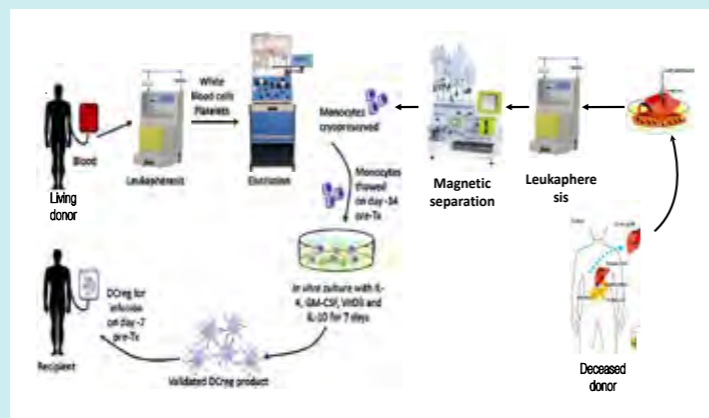


Figura 1. Schema rappresentativo del workflow della generazione delle cellule dendritiche tollerogeniche a partire dai monociti ottenuti per elutriazione dal prodotto di aferesi di donatori viventi o dal perfusato epatico di donatore cadavere utilizzando un separatore cellulare su campo magnetico.

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 essere 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 prevenendo 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 Thomson 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 2021

Il perfusato epatico è costituito da neutrofili (45-90%), linfociti (20-45%) and monociti (5-10%). L'aferesi del perfusato da donatore cadavere deve essere iniziata a ridosso del prelievo per avere una resa cellulare migliore. Tutti i prodotti di aferesi comunque sono molto contaminati neutrofili/granulociti. Questa popolazione non può essere separata dalla frazione dei PBMC nemmeno tramite centrifugazione per gradiente di densità, il che suggerisce che la popolazione di neutrofili contaminanti ha la stessa densità dei linfo-monociti. Questo ci ha portato a concludere che questa frazione è rappresentata da una popolazione di low density granulocytes (LDGs), cioè granulociti che hanno degranolato perdendo così la loro originaria densità. Questa popolazione è stata descritta in pazienti affetti da malattie con infiammazione cronica come il Lupus (SLE). Le LDGs sono implicate nella patogenesi dell'SLE perché in uno stato infiammatorio, producono type I Interferoni e sono soggetti a spontanea NETosis (Neutrophils Extracellular Traps), processo coinvolto nel rilascio dei granuli intracellulari contenenti per esempio DNA. L'esocitosi del DNA causa l'aggregazione delle cellule vicine e apoptosi (clumping). Nel processamento del perfusato, il clumping cellulare ha causato perdita numerica del nostro prodotto cellulare. Per limitare questo effetto indesiderato, abbiamo inizialmente provato a ridurre la degranolazione dei granulociti aggiungendo un anti-aggregante al liquido di raccolta oltre che un enzima che distrugge il DNA (DNaseI). Questo accorgimenti hanno contribuito a ridurre la perdita cellulare, ma non a renderla ottimale (Fig 1A). Il prodotto di aferesi così ottenuto infatti contiene ancora una contaminazione di neutrofili >15% (Fig 1B). La percentuale di neutrofili per potere processare il perfusato per elutriazione, processo con il quale è possibile separare i monociti dai linfociti, deve essere inferiore al 3%

nel prodotto cellulare iniziale o input, altrimenti il processo di elutriazione fallisce (Fig 1C). Pertanto abbiamo testato un protocollo per separare direttamente i monociti utilizzando anticorpi monoclonali specifici per il recettore dei monociti CD14 coniugato al biglie magnetiche. Le cellule così marcate vengono fatte passare attraverso un campo elettromagnetico ottenendo una popolazione pura di monociti (>90%) (Fig 1D). Come atteso, il numero di monociti puri che abbiamo ottenuto (50-200x10⁶) era al di sotto di quanto atteso (circa 400x10⁶) (Fig 1E). Tuttavia, questo è un processo con grandi margini di miglioramento.

OBIETTIVI PER IL 2022

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 TNFα Per caratterizzare l'induzione di tolleranza immunologica nelle cellule T, valuteremo le citochine IFNγ, IL-17A, IL-4, Perforin, Granzyme-B, IL-10, IL-6, IL-12p70, IL-1β, IL-6 e TNFα secrete nel mezzo delle co-culture cellulari mDC/DCreg e linfociti alloigenici CD4+ and CD8+ T L'espansione della popolazione di cellule regolatorie Treg verrà determinata tramite citofluorimetria con gli anticorpi CD4+CD25+CD127-Foxp3^{high}.

Large-scale/clinical-grade isolation of monocytes from the product of perfusion of deceased liver donors. 2021, abbiamo dimostrato che è possibile ottenere su piccola scala Tol-DC a partire dai monociti isolati dal perfusato epatico di donatore cadavere. Durante l'anno in corso, proponiamo di fare uno scale-up del processo di isolamento e produzione delle Tol-DC. Per portare il processo di isolamento cellulare su un livello di purezza clinico, i monociti CD14+ verranno separati utilizzando lo strumento MACSProdigy cell separator (Miltenyi Biotec (Fig 2). Il know-how per la produzione di Tol-DCs a livello clinico e su larga scala verrà appreso presso i laboratori del Prof Angus Thomson a Pittsburgh.

Ottimizzazione del protocollo di isolamento dei precursori CD14+ biglie magnetiche. Abbiamo parzialmente ottimizzato il protocollo di isolamento dei monociti dal perfusato epatico in quanto ancora presente la contaminazione dei LDGs. Nel corso del 2022, proveremo a eliminare questi contaminanti utilizzando due markers differenti quali CD15 e CD66b e anticorpi coniugato a biglie magnetiche. Questo perché il CD15 è specificamente espresso da neutrofili che non hanno ancora degranulato, mentre il CD66b è più rappresentato dopo degranolazione.

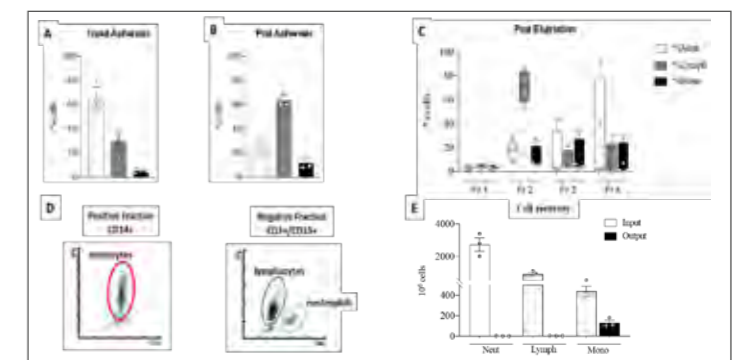


Figure 2. Cellular composition of liver perfusate (n=4) before (A) and after apheresis, using Com-TEC (B); elutriation, using ELUTRA (C); cellular isolation through magnetic beads separation, using AutoMacs. SFL/SSC plot of CD14+ fraction (left panel) and CD3+CD15+ fraction (right panel)(D). Subpopulations of Neutrophils, lymphocytes and monocytes after beads-conjugated depletion (E). Means ± SEM.

PRODOTTI: Farmaci biologici

Secretoma di cellule mesenchimali stromali umane nel trattamento di ferite cutanee croniche: soluzioni di rilascio a base di biomateriali

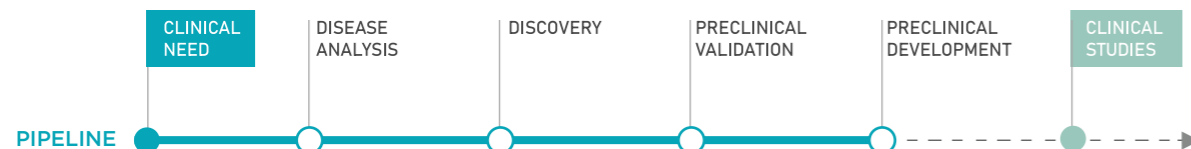
Cinzia Chinnici, PhD
cchinnici@fondazionerimed.com

COLLABORAZIONI

- Istituto Mediterraneo per i Trapianti e Terapie ad Alta Specializzazione (IRCCS ISMETT), Palermo, Italia
- Lab. di Polimeri Biocompatibili, Dipartimento STEBICEB, Università di Palermo, Italia
- Fondazione IRET, Ozzano dell'Emilia, Bologna, Italia

AREA TERAPEUTICA

Insufficienze d'organo



BREVE DESCRIZIONE

L'efficacia terapeutica delle MSCs è stata attribuita all'insieme dei fattori bioattivi e immunomodulatori secreti dalle cellule stesse (fattori di crescita, citochine, chemochine, vescicole extracellulari), complessivamente noti come secretoma e in grado di stimolare i processi endogeni di riparo del tessuto. Tuttavia, la somministrazione di secretoma necessita di un *delivery device* che ne consenta un rilascio prolungato al fine di garantirne l'efficacia terapeutica. Modalità e velocità con cui i fattori solubili vengono rilasciati in corrispondenza del tessuto bersaglio rivestono un'importanza fondamentale. L'obiettivo del progetto è fornire delle soluzioni di rilascio a base di biomateriali per la somministrazione *in vivo* del secretoma. Il progetto è articolato in tre fasi

nel seguente modo:

FASE 1: caratterizzazione della fonte cellulare (derma fetale e cordone ombelicale). L'obiettivo della fase 1 è identificare il "miglior secretoma" per applicazioni di medicina rigenerativa quali riparo di ulcera in soggetti diabetici o il riparo di ferite chirurgiche di difficile guarigione. I prodotti derivati dalla miglior fonte passeranno alla fase 2.

FASE 2: sviluppo di un prodotto per *wound healing* a base di un derivato dell'acido ialuronico (HA-EDA) formulato come hydrogel per *wound healing* (applicazione topica) e integrato con secretoma. L'HA-EDA hydrogel ha composizione definita e meccanismo d'azione previsto, è in grado di stabilizzare le proprietà del secretoma stesso e di fornirne le dosi previste.

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 costituirebbe un prodotto biologico pronto all'uso, più facile da gestire delle cellule e regolamentabile come farmaco per le applicazioni cliniche. Si è stimato che circa il 50% delle ferite cutanee di difficile guarigione non risponde ai vari trattamenti. Perciò, soluzioni innovative sono necessarie al fine di ottenere risultati consistenti e riproducibili.

RISULTATI RAGGIUNTI NEL 2021

È stato condotto il primo studio *in vivo* di efficacia del secretoma (preclinical proof of concept), testato in un modello murino di ulcera del piede diabetico. I risultati sono particolarmente interessanti perché suggeriscono un evidente effetto del secretoma nel potenziare l'efficacia terapeutica dell'acido ialuronico e gettano le basi per validazioni precliniche future. In particolare, l'applicazione di hydrogel + secretoma di cellule fetali dermiche ha determinato una completa chiusura dell'ulcera (ri-epitelializzazione) rispetto al veicolo, mentre gli altri due trattamenti (hydrogel solo e hydrogel integrato con secretoma di UC-MSCs) hanno determinato una chiusura parziale delle ulcere, anche se significativa. L'area de-epitelializzata residua è risultata significativamente minore rispetto al veicolo nelle ulcere trattate con hydrogel + secretoma di cellule fetali dermiche, e non nel caso dei altri due trattamenti. Inoltre, lo spessore epidermico è risultato significativamente maggiore rispetto al veicolo solo nelle ulcere trattate con hydrogel + secretoma da entrambi i tipi cellulari, e non nelle ulcere trattate col solo hydrogel. I dati relativi a vascolarizzazione, re-innervazione e analisi molecolare sono in corso.

OBIETTIVI PER IL 2022

Il prodotto identificato come il più promettente (HA hydrogel + secretoma di cellule fetali dermiche) sarà sottoposto a validazione preclinica e testato per efficacia in un modello differente di *skin*

FASE 3: studio dell'efficacia del prodotto hydrogel + secretoma da MSCs di fonti differenti (*preclinical proof of concept*). L'obiettivo della fase 3 è di testare l'efficacia del prodotto in un modello murino validato di ulcera del piede diabetico (topi dbdb con ulcera a pressione). Il prodotto più efficace passerà alla fase successiva di validazione (validazione preclinica) e sarà testato in un modello differente di *skin wound*: le ferite chirurgiche di difficile guarigione. Inoltre, si procederà con l'organizzare la produzione in GMP dei materiali, necessaria per i futuri test preclinici di sicurezza *in vivo* (safety).

wound (ferite chirurgiche di difficile guarigione). Tale modello risulta più simile alla situazione riscontrata in alcuni pazienti di ISMETT, aventi il sito chirurgico con tendenza alla cronicizzazione (possibilità di un trial clinico futuro). Nel corso della validazione preclinica si valuteranno parametri aggiuntivi (effetto *dose-dependent* e la qualità della cute rigenerata) in un numero più ampio di animali. Inoltre, si procederà con l'organizzare la produzione in GMP dei materiali, passo necessario per i futuri test preclinici di sicurezza *in vivo* (safety).

PUBBLICAZIONI

- Pitarresi G, Palumbo FS, Fiorica C, Bongiovanni F, Martorana A, Federico S, Chinnici CM, Giammona G. Composite Hydrogels of Alkyl Functionalized Gellan Gum Derivative and Hydroxyapatite/Tricalcium Phosphate Nanoparticles as Injectable Scaffolds for bone Regeneration. *Macromol Biosci*. 2021 Nov 10;e2100290. doi: 10.1002/mabi.202100290.
- Francipane MG, Douradinha B, Chinnici CM, Russelli G, Conaldi PG, Iannolo G. Zika Virus: A New Therapeutic Candidate for Glioblastoma Treatment. *Int J Mol Sci*. 2021 Oct 12;22(20):10996. doi: 10.3390/ijms222010996.
- Iannolo G, Sciuto MR, Cuscino N, Carcione C, Coronello C, Chinnici CM, Raffa GM, Pilato M, Conaldi PG. miRNA expression analysis in the human heart: Undifferentiated progenitors vs. bioprotective tissues-Implications for proliferation and ageing. *J Cell Mol Med*. 2021 Sep;25(18):8687-8700. doi: 10.1111/jcmm.16824.
- Pasqua M, Di Gesù R, Chinnici CM, Conaldi PG, Francipane MG. Generation of Hepatobiliary Cell Lineages from Human Induced Pluripotent Stem Cells: Applications in Disease Modeling and Drug Screening. *Int J Mol Sci*. 2021 Jul 30;22(15):8227. doi: 10.3390/ijms22158227.
- Chinnici CM, Russelli G, Bulati M, Miceli V, Gallo A, Busà R, Tinnirello R, Conaldi PG, Iannolo G. Mesenchymal stromal cell secretome in liver failure: Perspectives on COVID-19 infection treatment. *World J Gastroenterol*. 2021 May 7;27(17):1905-1919. doi: 10.3748/wjg.v27.i17.1905.
- Chinnici CM, Iannolo G, Cittadini E, Carreca AP, Nascari D, Timoneri F, Bella MD, Cuscino N, Amico G, Carcione C, Conaldi PG. Extracellular Vesicle-Derived microRNAs of Human Wharton's Jelly Mesenchymal Stromal Cells May Activate Endogenous VEGF-A to Promote Angiogenesis. *Int J Mol Sci*. 2021 Feb 19;22(4):2045. doi: 10.3390/ijms22042045.
- Miceli V, Bertani A, Chinnici CM, Bulati M, Pampalona M, Amico G, Carcione C, Schmelzer E, Gerlach JC, Conaldi PG. 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. *Int J Mol Sci*. 2021 Jan 6;22(2):510. doi: 10.3390/ijms22020510



Fig. 1 Spugna di hydrogel di acido ialuronico (HA) formulata per applicazione topica

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

Creazione di banche di cellule staminali pluripotenti indotte (iPSCs) *patient-specific*: modelli *in vitro* per terapia genica e drug discovery

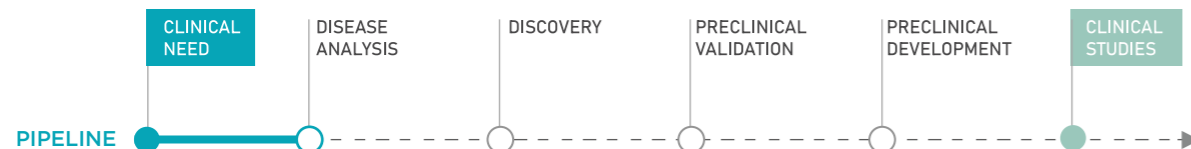
Cinzia Chinnici, PhD
cchinnici@fondazionerimed.com

COLLABORAZIONI

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

AREA TERAPEUTICA

Insufficienze d'organo



BREVE DESCRIZIONE

Le iPSCs umane adoperate in "disease modeling" costituiscono un approccio versatile e promettente per molte aree biomediche. Riprogrammando cellule somatiche "difettose" (ad esempio, fibroblasti derivati da pazienti) si ottiene una fonte potenzialmente illimitata di iPSCs che porta con sé il "difetto". In tal modo, malattie di varia natura possono essere investigate *in vitro* evitando di ricorrere, qualora sia possibile, ai modelli animali. Il "disease modeling" a base di iPSCs può essere adoperato per valutare tecniche di correzione del genoma umano (terapia genica), screening di farmaci e studio dei meccanismi patogenetici. In particolare, l'editing del genoma per la correzione di malattie metaboliche epatiche mediante patient-specific iPSCs è altamente promettente specialmente per la correzione di malattie monogeniche del fegato, (causate da un difetto in un singolo gene). L'obiettivo del progetto è quello di creare banche di iPSCs "patient-specific",

disponibili per studi di terapia genica e drug discovery. Le iPSCs in questione deriverebbero da pazienti pediatrici di ISMETT affetti da malattie metaboliche epatiche causate da una mutazione puntiforme. Per motivi logistici e grazie al supporto dei pediatri di ISMETT, saranno selezionate le malattie monogeniche appartenenti a un gruppo particolare: quelle in cui la malattia colpisce esclusivamente nel fegato, senza manifestazioni extra-epatiche (ad es., tyrosinemia type I, alpha-1-anti-trypsin deficiency, fenilchetonuria, Wilson's disease). La seconda ragione della scelta è che le mutazioni puntiformi si prestano ad essere corrette in maniera efficiente mediante l'approccio del "base editing", che determina la conversione diretta di una base, o di un paio di basi, con un'altra, e ha il potenziale di far regredire la malattia agendo esclusivamente sul fegato. Inoltre, il base editing è particolarmente indicato per correggere mutazioni puntiformi in cellule *non-dividing* come gli epatociti.

IMPATTO

Il programma di trapianto di fegato di IRCCS-ISMETT include pazienti pediatrici affetti da malattie metaboliche del fegato. La possibilità di usare il "genome editing" o testare farmaci innovativi per le malattie metaboliche epatiche ha implicazioni enormi nel determinare un miglioramento della qualità della vita dei pazienti. La possibilità di disporre di una in-house banca di patient-specific iPSCs rappresenta un fonte a disposizione di chiunque desideri intraprendere nuovi studi, ad esempio nel campo della terapia genica e del drug discovery, o per approfondire lo studio di meccanismi patogenetici.

RISULTATI RAGGIUNTI NEL 2021

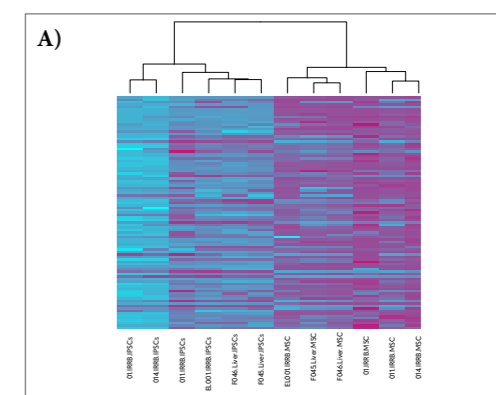
Nel corso dell'anno abbiamo acquisito un'expertise in generazione, espansione e banking di iPSCs umane. Abbiamo ottenuto iPSCs riprogrammando fibroblasti da derma fetale (4 campioni) e da fegato fetale (2 campioni) col metodo non-integrante del Sendai virus. Le iPSCs ottenute sono di buona qualità e stabili fin dai primi passaggi in coltura. Inoltre, i primi campioni ottenuti scongelati a distanza di due anni, hanno dimostrato un recovery eccellente in termini di vitalità (90%) e proliferazione, indicando la potenzialità di creare banche.

L'induzione della pluripotenza è stata valutata mediante espressione genica (TaqMan pluripotency card) paragonando le iPSCs con le cellule somatiche di origine, e immunofluorescenza per valutare l'espressione di markers di pluripotenza specifici (ad es., SOX2, TRA-1-60, SSEA4). Inoltre, l'analisi dei miRNA di vescicole extracellulari (EVs) delle iPSCs ha rivelato un profilo differente da quello delle cellule somatiche di origine, simile a quello di cellule staminali embrionali, confermando l'induzione della pluripotenza. Il differenziamento verso il lineage endodermico (endoderma definitivo) è stato eseguito in tutti e sei i campioni, rivelando il 70-85% di cellule differenziate.

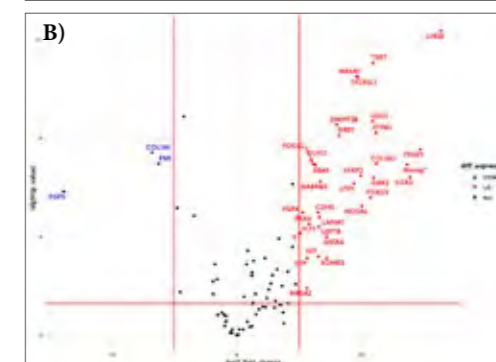
OBIETTIVI PER IL 2022

Ottenere biopsie cutanee da pazienti pediatriche con malattie metaboliche del fegato (presentazione del protocollo all'Internal Institutional Review Board di ISMETT per la donazione). Le biopsie serviranno per isolare in fibroblasti da riprogrammare per ottenere le patient-specific iPSCs. Le cellule ottenute saranno espanse e criocongelate per la creazione delle banche.

E' previsto un high-throughput sequencing del DNA genomico per ciascuna linea di iPSCs, al fine di confermare la mutazione genica puntiforme responsabile della malattia metabolica. Inoltre, secretoma ed EVs delle iPSCs saranno raccolti, aliquotati e congelati per eventuali studi futuri (ad es., biomarcatori della patologia).



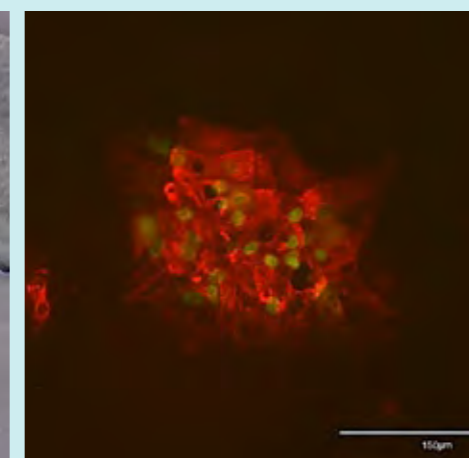
A) Clusterizzazione dei sei campioni di iPSCs vs fibroblasti di origine.



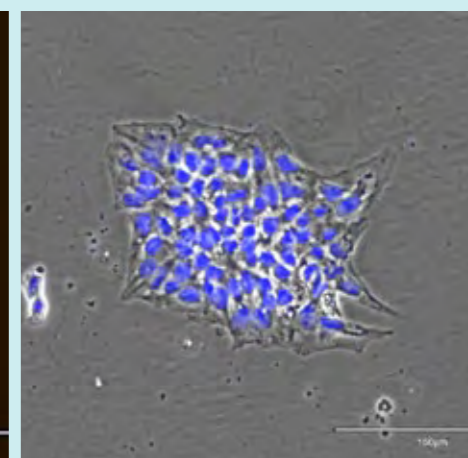
B) Volcano plots relativi ai geni di pluripotenza espressi in iPSC vs fibroblasti (MSCs)



A) Colonie di iPSCs in coltura a passaggio 20.



B) Immunofluorescenza con anticorpi anti-SSEA4 (rosso) e anti-TRA-1-60 (verde) mostrante una colonia di iPSCs positiva per i due markers di pluripotenza.



C) DAPI per il counterstain nucleare della stessa colonia

PRODOTTI: **Farmaci biologici**

Ottimizzazione di una terapia anti-fibrotica per fegato a base di vescicole extracellulari (EVs) e microRNAs: soluzioni di rilascio a base di biomateriali

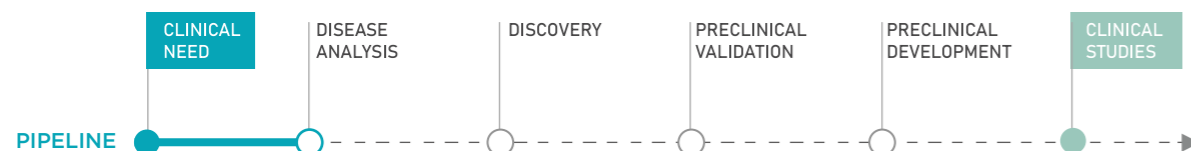
Cinzia Chinnici, PhD
cchinnici@fondazionerimed.com

COLLABORAZIONI

- Istituto Mediterraneo per i Trapianti e Terapie ad Alta Specializzazione (IRCCS ISMETT), Palermo, Italia
- Lab. di Polimeri Biocompatibili, Dipartimento STEBICEB, Università di Palermo, Italia
- Fondazione IRET, Ozzano dell'Emilia, Bologna, Italia

AREA TERAPEUTICA

Insufficienze d'organo



BREVE DESCRIZIONE

La fibrosi epatica è una condizione cronica potenzialmente regredibile se trattata a uno stadio precoce, ovvero prima che sfoci in cirrosi o HCC per i quali è necessario il trapianto d'organo. Sembrerebbe che i vari approcci anti-fibrotici disponibili non siano in grado di portare alla risoluzione della malattia, pur determinandone una riduzione significativa; pertanto, non esistono al momento trattamenti anti-fibrosi epatica approvati dall'FDA. A causa del forte *clinical need*, diversi farmaci anti-fibrotici sono in fase II e III dei trial clinici e molti sforzi si stanno compiendo al fine di migliorarne gli effetti. La ragione del limitato effetto terapeutico è stata in parte attribuita alla difficoltà della sostanza farmacologica di raggiungere le cellule epatiche

stellate (HSCs) attivate, presenti nel fegato in numero esiguo (5-8% delle cellule epatiche totali). Tali cellule sono considerate il principale target terapeutico dei vari trattamenti anti-fibrotici; perciò, numerosi sono i tentativi dedicati a implementare il rilascio mirato dei trattamenti a tali cellule. Tra questi, il *targeted delivery* verso le HSCs attivate, che è considerato il futuro delle terapie anti-fibrotiche per fegato. L'approccio è "safe" ed è stato testato con successo per rilasciare farmaci o specifici miRNAs alle HSCs, ma non è stato ancora testato per il rilascio di secretoma, vescicole extracellulari (EVs) o altri prodotti biologici ad azione anti-fibrotica. È interessante notare che una modalità di *targeted delivery* alle HSCs attivate è basata sull'interazione ligando-recettore: ovvero

IMPATTO

La progressione della fibrosi epatica può determinare l'insorgenza di insufficienze epatiche terminali come cirrosi ed epatocarcinoma (HCC), per i quali il trapianto di fegato è il solo trattamento efficace. La scarsità di organi disponibili per il trapianto e la terapia immunosoppressiva a vita determinano un forte clinical need di trattamenti anti-fibrotici in grado di portare a una risoluzione della malattia.

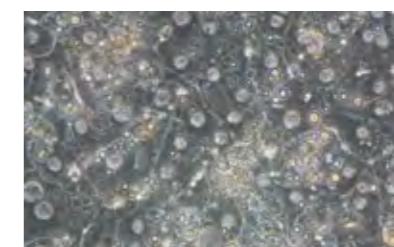
RISULTATI RAGGIUNTI NEL 2021

Il secretoma è stato raccolto da MSCs da fegato e da derma fetale, e da iPSCs in coltura (quest'ultime ottenute dalle prime mediate *in vitro* reprogramming col metodo del Sendai virus). Le EVs dei due tipi cellulari sono state isolate per ultracentrifugazione differenziale del secretoma e caratterizzate mediante *Nanotracking Particle Analysis* (NTA) and

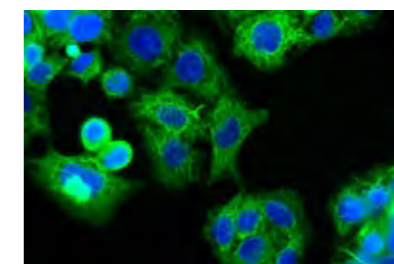
western blot. L'analisi dei miRNA cargo ha rivelato un arricchimento (Ct values < 23) in miRNA anti-fibrotici e ad azione anti-infiammatoria nelle EVs di entrambi i tipi cellulari. Inoltre, l'elevato contenuto di RNA totale (4 volte più concentrato) osservato all'interno delle EV-iPSCs rispetto alle EV-MSCs, insieme al maggior numero di EV-iPSCs (10 fold maggiore) rispetto alle EV-MSCs, ottenuto processando volumi uguali di secretoma, suggerisce una maggiore scalabilità del processo di produzione di EV-iPSCs rispetto alle EV-MSCs.

OBIETTIVI PER IL 2022

Studi di efficacia *in vitro* di secretoma, EVs e miRNA cocktail (effetto dose-dependent) in modelli di fibrosi epatica (colture cellulari); design di sistemi di rilascio a base di HA (*nanocarriers* e *hydrogel depot*) per il *targeted delivery* e il rilascio prolungato dei vari trattamenti; selezione del "miglior" derivato dell'HA mediante analisi computazionale (interazione ligando-recettore: HA-CD44); fabbricazione di *nanocarriers* specifici e *hydrogel depot*; integrazione biomateriale + prodotto cellulare e studi di cinetica di rilascio *in vitro*.



Epatociti adulti umani in coltura



Immunofluorescenza su epatociti adulti umani in coltura con anticorpo anti-CK18 (verde) e DAPI per il counterstain nucleare (blu).

tra il ligando acido ialuronico (HA) e il suo recettore CD44, che è overexpresso dalle HSCs durante la fibrosi. Considerato l'effetto anti-fibrotico di secretoma ed EVs (riduzione del 20-30% in modelli animali), l'obiettivo del progetto è di ottimizzare l'approccio fornendo sistemi di rilascio a base HA, formulati sia per il *targeted delivery* (*nanocarriers*) che per il rilascio prolungato (*hydrogel depot*) dei prodotti cellulari solubili. Questa seconda formulazione sarà usata nel caso in cui il primo approccio risultasse poco efficace. È da notare che, ad eccezione di un unico caso, la somministrazione di secretoma e EVs in modelli animali di danno epatico sia acuto che cronico, è avvenuta in assenza di sistemi di rilascio, il che potrebbe essere uno dei motivi dello scarso *outcome*. Il progetto prevede tre fasi articolate nel seguente modo:

FASE 1. Produzione e caratterizzazione di secretoma ed EVs da MSCs e da iPSCs; comparazione tra EV-miRNA di MSCs vs. EV-miRNAs di iPSCs; selezione di specifici miRNAs per il cocktail (anti-fibrotici e anti-infiammatori); valutazione dell'effetto anti-fibrotico dei vari prodotti biologici e dei miRNAs in modelli cellulari di fibrosi epatica; analisi computazionale (interazione ligando-recettore) per selezionare il derivato dell'HA più adatto al *targeted delivery*;
FASE 2. Produzione dei vari biomateriali a base di HA; integrazione dei biomateriali con i prodotti cellulari (secretoma e EVs) e miRNAs; studi di cinetica di rilascio *in vitro*;
FASE 3. Studio di efficacia dei vari trattamenti (*preclinical proof of concept*) in un modello murino di fibrosi epatica.

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

Il cordone ombelicale umano nell'ambito del progetto PROMETEO: da tessuto scartato a possibile fonte di cura

Simona Corrao, PhD
scorrao@fondazionerimed.com

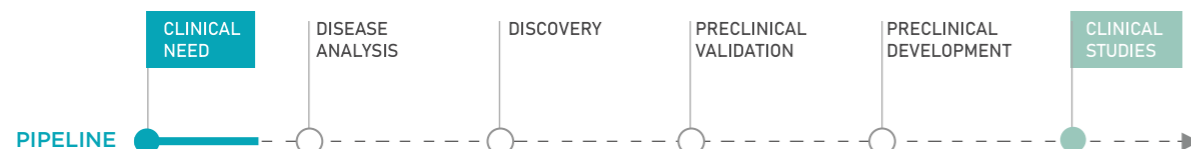
COLLABORAZIONI

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

- Casa di Cura Candela, Palermo, Italia

AREA TERAPEUTICA

Insufficienze d'organo



BREVE DESCRIZIONE

Il Progetto PROMETEO ha lo scopo di valutare l'uso di cellule derivanti da tessuti perinatali per il trattamento di patologie croniche su base infiammatoria, causa di insufficienza d'organo. Tra queste, oltre alle epatopatie (una delle maggiori cause di problemi di sanità pubblica e di morte a livello mondiale), si pongono anche le disfunzioni della parete uterina che influiscono negativamente sulla riuscita di una gravidanza a causa di un assottigliamento della componente endometriale, scarsamente ricettiva.

Le cellule dello stroma del cordone ombelicale (hUC-MSCs) sono estensivamente usate in studi recenti sul trattamento degli stati infiammatori (ad esempio, delle conseguenze da Covid-19).

L'elevato numero di cellule stromali in un tessuto considerato di scarto, l'impatto positivo legato a problemi etici, ed il loro potere immunoregolatore, antinfiammatorio e, presumibilmente, stimolante la rigenerazione cellulare, anche tramite rilascio di vescicole extracellulari (EVs), fanno del cordone una promettente fonte di prodotti cellulari per le terapie avanzate. Le analisi su EVs e microRNA (miRNA) in esse contenuti, oltre ai fattori solubili rilasciati dalle hUC-MSCs nell'ambiente extracellulare, e la messa a punto di modelli sperimentali che rispecchino l'aspetto clinico patologico a carico dell'endometrio, permetterà di stabilire gli eventuali fenomeni riparativi e di ripresa funzionale del tessuto danneggiato.

IMPATTO

Qualora le sperimentazioni sui modelli in vitro dimostrino che le hUC-MSCs ed i suoi derivati (EVs e/o fattori solubili) siano capaci di favorire la rigenerazione tissutale e modulare i processi infiammatori a carico del tessuto endometriale, le hUC-MSCs potrebbero essere utilizzate in ambito clinico nelle terapie di pazienti altrimenti sottoposte a trattamenti che non hanno ancora dato una completa efficacia (scratch endometriale, immunoglobuline, glucocorticoidi, anticoagulanti). L'elevato numero di MSCs ottenibili da ogni cordone, la capacità di attivazione dei meccanismi riparativi, anti-fibrotici, anti-batterici, pro-angiogenici, generati dalle cellule o, eventualmente, dai loro prodotti di secrezione (molecole immunosoppressive e miRNA contenuti nelle EVs), potrebbero essere alla base di una attività di produzione cellulare elevata per programmi di terapia di riparo e di ripristino della funzionalità tissutale. Sviluppare prodotti cellulari, attraverso la produzione secondo le norme GMP, porterebbero alla generazione di un prodotto medicinale alternativo rispetto alle consuete terapie farmacologiche che, a lungo andare, possono comunque indurre un serio danno cellulare. Ciò favorirebbe, quindi, non solo un netto miglioramento della qualità della vita delle pazienti ma anche una riduzione dei fallimenti terapeutici, del numero di impianti embrionali, dei costi di gestione sanitaria e ospedaliera.

RISULTATI RAGGIUNTI NEL 2021

Il cordoni ombelicali, forniti dalla Casa di Cura Candela, sono stati usati per isolare, caratterizzare, espandere, e creare una banca di hUC-MSCs a scopo di ricerca (Fig.1A). Le cellule ottenute a passaggio p0 sono state caratterizzate sia mediante immunofluorescenza (Fig.1B) che in citofluorimetria, per i seguenti marcatori:

Marcatori Negativi: HLA-DR, CD34, CD31, CD45, CD14, CD324;
Marcatori Positivi: CD105, CD90, CD73, CD166, CD146, CD29, CD13, CD44. Le subcolture a p1 e p2 hanno dato informazioni utili per lo 'scale up' in caso di produzione cGMP.

Le EVs rilasciate da n=3 lotti di hUC-MSCs a p3 sono state valutate al NanoSight. Il contenuto in miRNA è stato effettuato mediante RT-PCR per determinare quali fossero quelli comuni a tutti e tre i lotti (donatrice-indipendente) e, soprattutto, i miRNA differenziali (donatrice-dipendente), che potrebbero determinare la creazione di una 'impronta digitale' donatrice-specifica.

In collaborazione con il Dr. Giovanni Zito (IRCCS-ISMETT), è stato ipotizzato un modello *in vitro* di endometrio patologico che prevede la co-cultura di cellule stromali ed epiteliali responsive ad ormoni su cui sperimentare le capacità riparatrici delle MSCs perinatali.

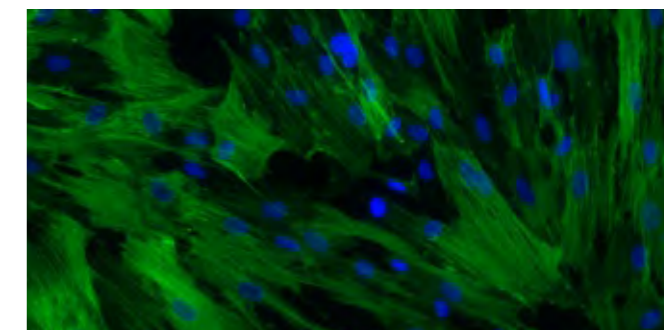
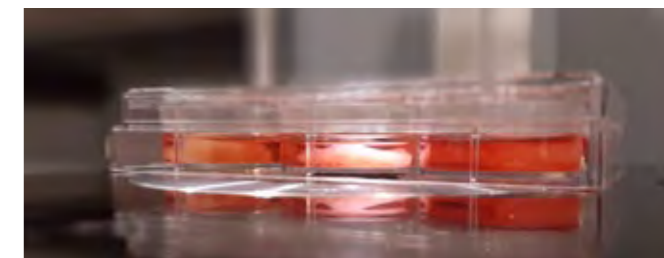


Isolamento di MSCs da cordone ombelicale umano mediante tecnica non-enzimatica e follow-up della coltura al microscopio ottico

OBIETTIVI PER IL 2022

Le hUC-MSCs verranno sottoposte ad un ambiente di tipo altamente infiammatorio (citochine tipiche di molte patologie che portano ad una disfunzione d'organo) per la successiva analisi di fattori di rilascio e miRNA che mostrano un potere riparatorio, anti-infiammatorio, immunomodulatorio. Poiché la risposta data dall'interazione cellula-cellula potrebbe risultare notevolmente differente, rispetto alle sole molecole presenti nel mezzo condizionato, le hUC-MSCs dovrebbero essere messe in co-cultura diretta con tipologie cellulari appropriate (endometriali, ma non solo). Tali informazioni possono aprire nuovi scenari di utilizzo per il trattamento delle disfunzioni endometriali, ma anche a carico di altri organi estremamente compromessi dagli eventi infiammatori (fegato, polmone, sistema cardiovascolare, sistema nervoso). Tali indagini saranno condotti in collaborazione con IRCCS-ISMETT e sarà di fondamentale importanza nella comprensione dei possibili meccanismi di riparazione tissutale indotta dalle hUC-MSCs.

La creazione del modello con cellule endometriali responsive agli ormoni occuperà una parte importante del progetto per l'anno 2022. Poiché il progetto PROMETEO coinvolge anche MSCs da altre fonti, le indagini sulle hUC-MSCs verranno eseguite in parallelo per un più rapido raggiungimento degli scopi finali del progetto nella sua interezza e complessità. Questo terrà in considerazione l'attività di un team di ricercatori che lavorano sia in Ri.MED che in IRCCS-ISMETT.



Immunofluorescenza per l'actina del muscolo liscio (α-SMA), tipica di un sottotipo di cellule fibrogeniche attivate (miofibroblasti), espressa dalle hUC-MSCs.

PUBBLICAZIONI

- Pampalone M, Corrao S, Amico G, Vitale G, Alduino R, Conaldi PG, Pietrosi G. Human Amnion-Derived Mesenchymal Stromal Cells in Cirrhotic Patients with Refractory Ascites: A Possible Anti-Inflammatory Therapy for Preventing Spontaneous Bacterial Peritonitis. *Stem Cell Rev Rep*. 2021 Jun;17(3):981-998. doi: 10.1007/s12015-020-10104-8. Epub 2021 Jan 3. PMID: 33389680; PMCID: PMC8166706.

PRODOTTI: **ATMP** (Advanced Therapy Medicinal Products) - **Dispositivi biomedicali e Organi artificiali**

Sviluppo e caratterizzazione di un dotto biliare bioingegnerizzato

Maria Giovanna Francipane, PhD
mgfrancipane@fondazionerimed.com

Mattia Pasqua, PhD
mpasqua@fondazionerimed.com

COLLABORAZIONI

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

AREA TERAPEUTICA

Insufficienze d'organo



BREVE DESCRIZIONE

Questo programma di ricerca verte sulla ricostruzione di porzioni dell'albero biliare mediante approcci di ingegneria dei tessuti, in cui cellule e biomateriali vengono combinati al fine di creare dispositivi medici impiantabili nell'uomo. La nostra attenzione è in particolare diretta verso il coledoco, il dotto biliare che trasporta la bile dal fegato al duodeno. L'esigenza clinica racchiude varie colangiopatie che includono l'atresia biliare, il colangiocarcinoma distale, le cisti e le lesioni derivanti dal trapianto di fegato o altre procedure eseguite sulle vie biliari o altri organi dell'epigastrio.

Queste patologie causano principalmente stenosi del dotto che progressivamente porta ad una risposta infiammatoria ed

eventualmente insufficienza epatica. Le strategie terapeutiche per le colangiopatie del coledoco sono poche e richiedono nella maggior parte dei casi il trapianto d'organo. Tuttavia, a causa della carenza di donatori di organi e data la sostanziale mortalità, morbilità e gli elevati costi associati, sono necessarie nuove alternative terapeutiche. Tra queste, vari gruppi di ricerca lavorano sullo sviluppo di un dotto biliare bioingegnerizzato, ma al momento, i risultati presenti nella letteratura scientifica sono scarsi e difficilmente traslabili nella pratica clinica. Anche il nostro gruppo di ricerca sta attivamente lavorando in questa direzione, partendo dall'ottimizzazione della fonte cellulare e del biomateriale.

IMPATTO

Lo sviluppo di un coledoco bioingegnerizzato rappresenterebbe una svolta significativa nel campo delle terapie avanzate per il trattamento di determinate colangiopatie. Nonostante l'urgenza di terapie alternative a quelle esistenti, ad oggi non esistono dotti biliari bioingegnerizzati utilizzati in clinica per ragioni che riguardano sia la fonte cellulare che il biomateriale più idoneo da utilizzare, che deve possedere importanti proprietà in termini di biocompatibilità e biodegradabilità.

L'approccio scientifico che perseguiamo mira a realizzare un dispositivo medico impiantabile e di conseguenza, la scelta della fonte cellulare e del biomateriale di supporto è dettata in prospettiva di un'applicazione clinica. Molti degli studi precedenti in questo campo si basano principalmente su costrutti acellulari. Seppur alcuni di questi abbiano mostrato risultati incoraggianti, nella maggior parte dei casi tali studi sono inconcludenti e con scarsa caratterizzazione preclinica. Più recentemente, si è evidenziato che per un risultato terapeutico efficace, un dotto biliare bioingegnerizzato dovrebbe essere costituito da un biomateriale colonizzato da cellule. A partire da questi studi, il nostro obiettivo è quello di realizzare un costrutto che, prima di essere trapiantato, sia già colonizzato da cellule. Inoltre, tra gli altri obiettivi c'è quello di eseguire una profonda analisi su modelli animali, che aprirà la strada per una futura sperimentazione clinica.

RISULTATI RAGGIUNTI NEL 2021

Nel corso dell'anno 2021 abbiamo selezionato i materiali più idonei al nostro dispositivo e ottimizzata la loro concentrazione in base alle proprietà meccaniche e alla risposta cellulare, in termini di colonizzazione, vitalità e funzionalità. La densità cellulare è stata anche ottimizzata seminando concentrazioni differenti di cellule. In questa prima fase abbiamo utilizzato una linea di colangiocarcinoma, ma gli esperimenti futuri saranno svolti con cellule primarie che isoleremo da campioni clinici, grazie all'approvazione del protocollo etico sottomesso quest'anno. Per realizzare una struttura simile al coledoco abbiamo generato uno stampo di acido poli-L-lattico, tramite 3D printing. Lo stampo è composto da due pareti esterne ed un bastoncino centrale, e ha dimensioni di un coledoco umano. Per la fabbricazione del coledoco bioartificiale abbiamo utilizza-

to due tecniche. Abbiamo miscelato i colangiociti con fotocollagene, e versata questa miscela nello stampo. Dopo incubazione a 37 °C per 30 minuti abbiamo rimosso le pareti esterne dello stampo e lasciato il bastoncino. A seguito di fotopolimerizzazione del fotocollagene mediante esposizione ai raggi UV, abbiamo immerso il tubo in un secondo biopolimero dotato di un rivestimento esterno con proprietà meccaniche. A questo punto abbiamo rimosso il bastoncino, ottenendo un tubo rivestito da agarosio solo esternamente. Le proprietà biologiche e meccaniche del costrutto sono in fase di studio.

OBIETTIVI PER IL 2022

Una volta ottimizzati tutti i parametri di coltura cellulare utilizzando le cellule di colangiocarcinoma, l'obiettivo è quello di estrarre le cellule umane primarie dai tessuti che arrivano dalla clinica, e studiarne il comportamento quando saranno seminate sui biomateriali ottimizzati durante gli esperimenti precedenti.

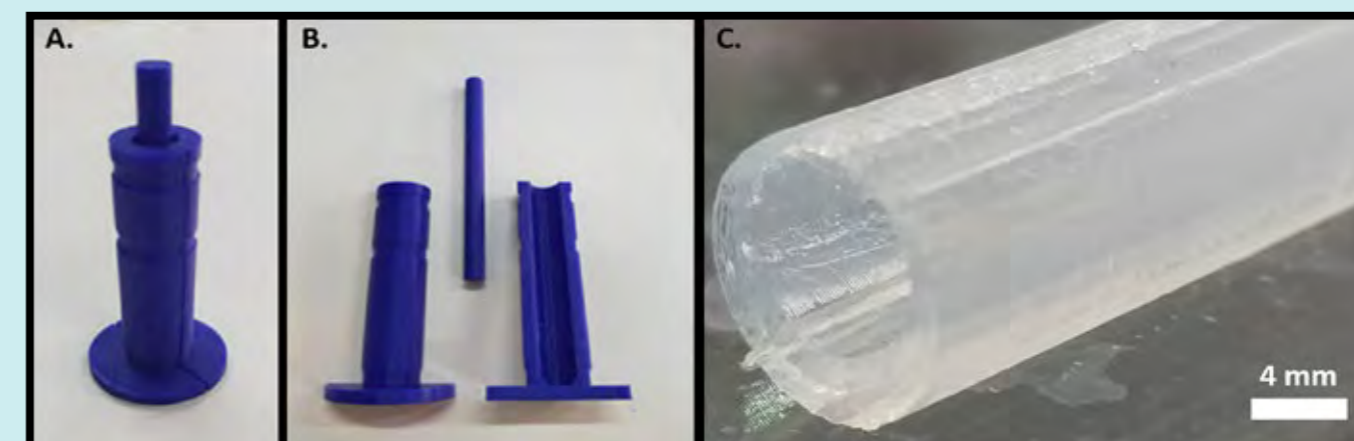
Il dispositivo biomedico verrà ulteriormente caratterizzato da un punto di vista biologico e meccanico. Inoltre, in previsione di test di biocompatibilità, risposta immunitaria, sicurezza ed efficacia del dispositivo medico su modelli animali, provvederemo a redigere un protocollo da sottomettere all'O.P.B.A.

CONFERENZE

Ri.MED Research Retreat, Dicembre, 2021, Palermo. Pasqua, M; Di Gesù, R; Francipane, M. G. Development and Characterization of a Bioengineered Bile Duct.

PUBBLICAZIONI

- Pasqua, M., Di Gesù, R., Chinnici, C.M., Conaldi P.G., Francipane, M.G. (2021). Generation of Hepatobiliary Cell Lineages from Human Induced Pluripotent Stem Cells: Applications in Disease Modeling and Drug Screening. *Int J Mol Sci.* 22(15):8227. DOI: 10.3390/ijms22158227



Immagini dello stampo (A e B) e del coledoco bioartificiale (C).

PRODOTTI: Dispositivi biomedicali e Organi artificiali

Sviluppo di un modello di osteoartrite ex vivo sensibile ad inibitori di mTORC1 attraverso la riduzione dello stress ossidativo e la promozione di meccanismi autofagici

Riccardo Gottardi, PhD
rgottardi@fondazionerimed.com

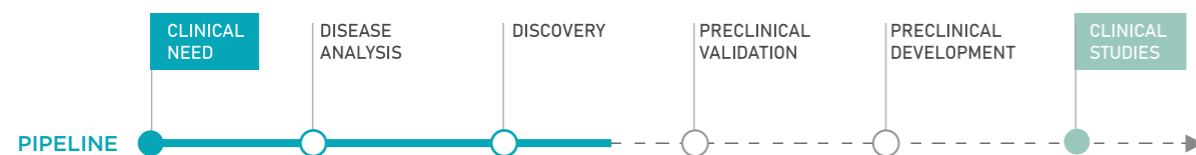
Roberto Di Gesù, PhD
rdigesu@fondazionerimed.com

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
- Istituto Mediterraneo per i Trapianti e Terapie ad Alta Specializzazione (IRCCS ISMETT), Palermo, Italia
- Reparto di chirurgia ortopedica, clinica Buccheri La Ferla, Palermo (Italia)

AREA TERAPEUTICA

Insufficienze d'organo



BREVE DESCRIZIONE

L'osteoartrite (OA) è una malattia articolare cronica, che provoca dolore, gonfiore, deformazione e, nei casi più gravi, ipomobilità dell'articolazione. È facile intuire che tale condizione patologica interferisce negativamente con le normali attività quotidiane come gli spostamenti e, nei casi più gravi, l'espletamento di azioni fondamentali per condurre una vita normale. Questo, determina una condizione invalidante e può anche richiedere un supporto assistenziale.

La cartilagine ialina è l'area articolare maggiormente coinvolta. Tuttavia, i meccanismi molecolari responsabili dell'osteoartrite sono complessi e interconnessi e interessano tutte le

strutture articolari accessorie come l'osso subcondrale, la sinovia, i muscoli e i legamenti. Recenti studi epidemiologici⁴ hanno evidenziato la correlazione età-OA basandosi sull'evidenza che l'incidenza di OA nella popolazione over 75 è 4 volte maggiore rispetto a soggetti di 40 anni per OA dell'anca e di ben 14 volte più alta per l'OA al ginocchio.

Sono state inoltre segnalate co-morbilità legate all'età con un'incidenza compresa tra il 14% e il 20%. Il punto di contatto tra OA ed età è stato trovato nel disturbo intestinale noto come *leaky gut* (LG), che è una delle più frequenti co-morbilità legate all'età dell'OA⁶. L'eziologia del *leaky gut* è collegata ad una di-

IMPATTO

Nell'ultimo decennio, studi interdisciplinari che coinvolgono la medicina rigenerativa, la biologia molecolare e la chimica farmaceutica hanno cercato di scoprire nuovi *pathways* coinvolti nell'OA da utilizzare come target per approcci farmacologici innovativi. Tuttavia, la sfida è particolarmente difficile a causa di meccanismi molecolari eterogenei correlati all'OA che coinvolgono un'ampia pletora di fattori biochimici. Molto recentemente, le vie attivate dall'interazione del lipopolisaccaride (LPS) con il suo recettore extracellulare (recettore toll-like 4, TLR4) nei condrociti sono state strettamente correlate con l'insorgenza dell'osteoartrite. Il nostro lavoro è incluso in questo scenario complesso e mira a creare un modello 3D ex vivo stimoli-responsivo che imita l'OA correlata al *leaky gut*. I nostri risultati incoraggianti suggeriscono che il nostro modello avrà un forte impatto nello sviluppo di una nuova terapia farmacologica mirata all'osteoartrite secondaria all'attivazione del recettore TLR-4. Il modello sarà utilizzato come banco di prova affidabile e realistico per nuove molecole ad effetto terapeutico e per testare *drug delivery systems* innovativi (DDS).

RISULTATI RAGGIUNTI NEL 2021

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.

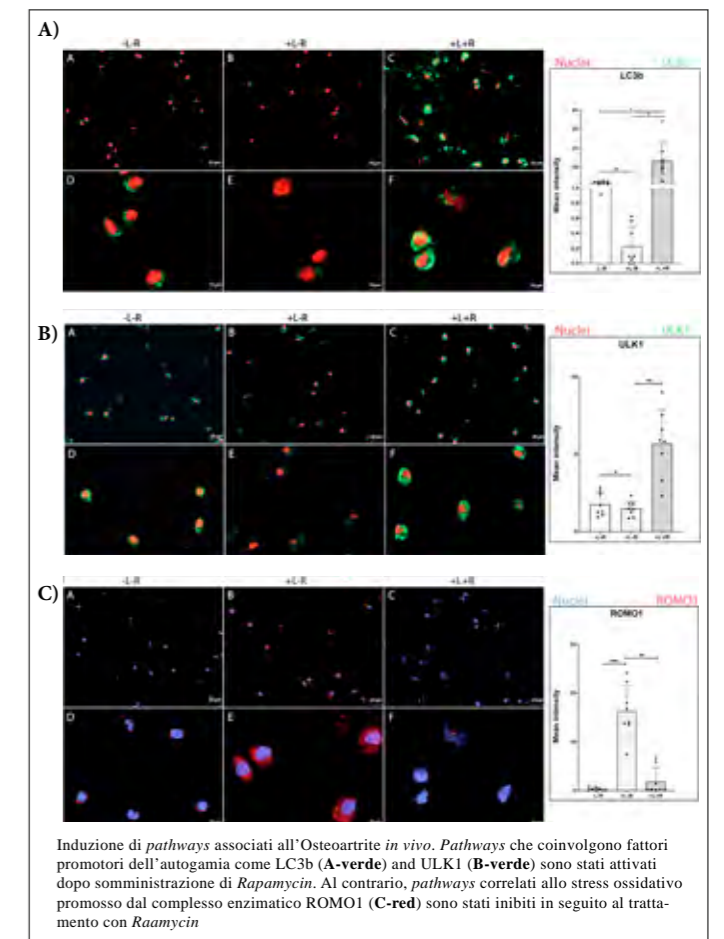
Tra le modificazioni più evidenti, abbiamo riscontrato una perdita di contenuto in proteoglicani e una massiccia fibrillazione cartilaginea. Il trattamento dei tessuti con un farmaco antinfiammatorio ha portato ad una completa regressione della patologia indotta, ricostituendo una struttura molto simile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

sregolazione dell'omeostasi nell'epitelio intestinale, che è composto principalmente da enterociti ricoperti da uno strato di muco protettivo. Qui, le cellule sono interconnesse tra loro attraverso tight junctions, una connessione cellula-cellula che riduce a zero i gap intercellulari che bloccano la traslocazione paracellulare di sostanze. Nel LG si genera una lassità parziale o totale delle tight junctions, provocando la diffusione nel flusso sanguigno di LPS prodotto dal microbiota residente ed innescando risposte infiammatorie sistemiche (SIR) che danneggiano, tra gli altri organi, anche le cartilagini articolari.

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 2022

L'obiettivo per il 2022 è quello di andare avanti attraverso lo sviluppo di nuove molecole biologicamente attive in grado di interagire con i *pathways* modulati dall'attivazione del TLR-4. Nuove molecole saranno testate utilizzando il nostro modello come screening pre-clinico. Inoltre, il modello sarà ulteriormente ottimizzato utilizzando una versione aggiornata del nostro bioreattore bifasico basato su una nuova configurazione che coinvolge i sistemi di efflusso che consentono di raccogliere i mezzi di coltura condizionati.



CONFERENZE

29th Annual Meeting EUROPEAN ORTHOPAEDIC RESEARCH SOCIETY (EORS), September 15th-21th, 2021, Rome (Italy). Development of a realistic stimuli-responsive ex vivo OA model to study the gut-joint axis.

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



BREVE DESCRIZIONE

L'infusione di linfociti T virus specifici rappresenta una valida e alternativa strategia terapeutica ai farmaci anti-virali 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 garantirà la disponibilità di un prodotto "pronto all'uso", nello specifico cellule derivanti da un donatore HLA - compatibile, da somministrare al paziente al momento della diagnosi di una complicanza post-trapianto virus-relata.



IMPATTO

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

Una possibilità alternativa, ormai validata clinicamente, è rappresentata dai linfociti T virus-specifici, come prodotto Medicinale di Terapia Avanzata (ATMP). L'infusione di tali cellule del sistema immunitario consente al paziente di sviluppare *in vivo* una risposta citotossica nei confronti delle cellule infettate la quale potrebbe risultare efficace sia nella profilassi sia come terapia per trattare manifestazioni patologiche virus-indotte potenzialmente letali per il paziente.

RISULTATI RAGGIUNTI NEL 2021

Durante il 2021 abbiamo ottimizzato l'espansione *ex vivo* di 6 lotti di cellule T multivirus specifiche attraverso l'utilizzo di due sistemi innovativi per la coltura delle cellule (G-Rex®10 e G-Rex®10M Open System). I sistemi utilizzati permettono di ottenere una resa maggiore del prodotto finale con meno interventi da parte degli operatori ed utilizzando meno reagenti e fattori di crescita. Sono

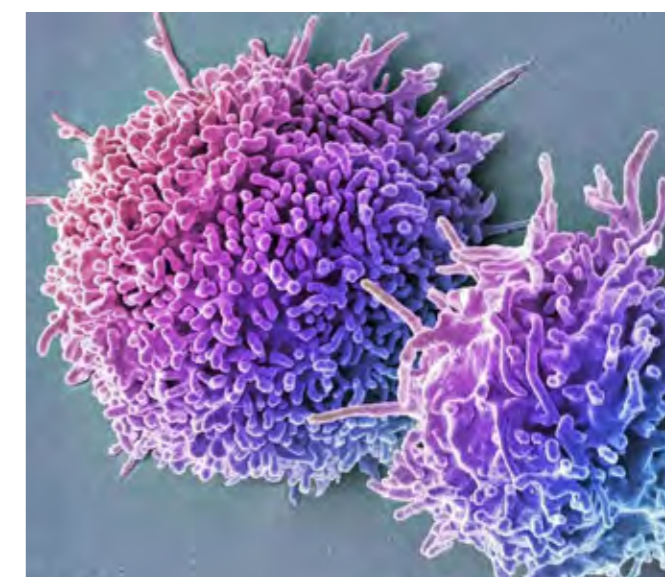
stati analizzati, ad intervalli temporali regolari, la concentrazione di glucosio e di lattato deidrogenasi nel mezzo di coltura, quali indicatori di crescita alternativi alla classica conta cellulare. Inoltre, sono stati effettuati i consueti saggi di controllo qualità, specificità e potenza (test Elispot, immunofenotipo e test di citotossicità) che ci hanno permesso di definire il sistema di coltura più efficiente per una crescita cellulare ottimale fra quelli testati.

OBIETTIVI PER IL 2022

Al termine delle qualifiche della strumentazione e della convalide microbiologica degli ambienti produttivi, consegnati a dicembre 2021, seguiranno le convalide dei processi base della cell factory (vestizione, passaggio materiali ecc.) e si avvieranno le convalide legate alla produzione di linfociti T multivirus specifici (Media Fill e convalida di processo).

PUBBLICAZIONI

- Complete intra-laboratory validation of a LAL assay for bacterial endotoxin determination in EBV-specific cytotoxic T lymphocyte Salvatore Pasqua, Maria Concetta Niotta, Giuseppina Di Martino, Davide Sottile, Bruno Douradina, Monica Miele, Francesca Timoneri, Mariangela Di Bella, Nicola Cuscino, Chiara Di Bartolo, Pier Giulio Conaldi, and Danilo D'Apolito Mol Ther Methods Clin Dev. 2021 Sep 10; 22: 320-329. PMID: 34514024
- Successful Use of Heterologous CMV-Reactive T Lymphocyte to Treat Severe Refractory Cytomegalovirus (CMV) Infection in a Liver Transplanted Patient: Correlation of the Host Antiviral Immune Reconstitution with CMV Viral Load and CMV miRNome. Miele M, Gallo A, Di Bella M, Timoneri F, Barbera F, Sciveres M, Riva S, Grossi P, Conaldi PG. Microorganisms. 2021 Mar 26;9(4):684. doi:10.3390/microorganisms9040684. PMID: 33810329



PRODOTTI: **ATMP** (Advanced Therapy Medicinal Products) - **Farmaci biologici**

Cellule staminali mesenchimali per le malattie del fegato: sviluppo di una possibile terapia per prevenire la peritonite batterica spontanea in pazienti con cirrosi epatica

Mariangela Pampalone
mpampalone@fondazionerimed.com

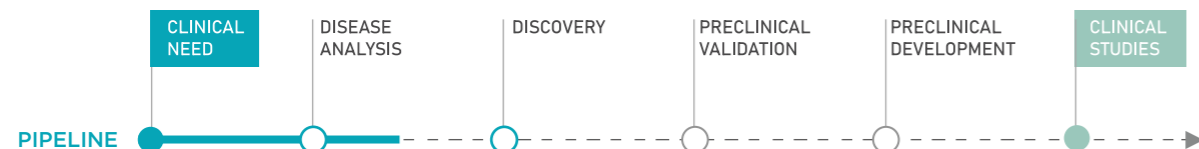


COLLABORAZIONI

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

AREA TERAPEUTICA

Insufficienze d'organo



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 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)

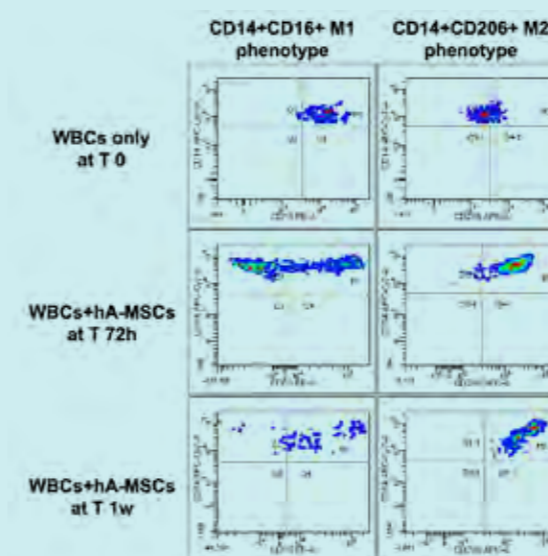
Le alterazioni funzionali delle difese batteriche dell'immunità umorale aspecifica e cellulo-mediata, facilitano l'attecchimento di infezioni nelle varie sedi, incluso il liquido ascitico, con il rischio di sviluppare PBS (Peritonite Batterica Spontanea). In questo stu-

dio è stato valutato l'effetto delle cellule mesenchimali amniotiche umane, hA-MSCs, sul fluido ascitico di pazienti con cirrosi epatica in presenza di infezione.

A representative dot plot showing CD14+CD16+ M1- and M2-like macrophages from total WBCs in post-paracentesis (T 0) AF, in which M1-like cells are prevalent compared with M2-like cells after 72 h of co-culture with hA-MSCs, when the high increase of M2 macrophages was observed, and after 1 week of co-culture with hA-MSCs, in which M2-like cells increased more than M1, even though the latter were still present

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 2021

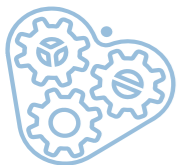
Sono stati condotti studi per valutare l'effetto delle cellule mesenchimali amniotiche (hAMSCs) sul liquido ascitico proveniente da pazienti cirrotici (Child-Turcotte-Pugh B e C) sottoposti a paracentesi ed infettati con carbapenem-resistant Enterobacterales. I risultati precedenti hanno mostrato che le cellule a contatto con il fluido ascitico non presentano variazioni morfologiche, inibizioni alla proliferazione, variazioni fenotipiche né valori di necrosi/apoptosi significativi ed una diminuzione della produzione di citochine pro-infiammatorie associata ad una maggiore polarizzazione antinfiammatoria della componente macrofagica M2-like in presenza delle hA-MSCs. I dati non hanno tuttavia mostrato un decremento significativo della componente macrofagica M1-like che potrebbe determinare una continua attività fagocitica per il ripristino delle condizioni fisiologiche. Ulteriori studi sono stati condotti al fine di valutare sia la carica batterica finale del liquido ascitico in seguito a trattamento con hA-MSCs, sia la concentrazione nel secretoma di alcune proteine del complemento (MBL, Ficoline, C3a) responsabili della paralisi immunitaria. 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 2022

Indagini proteomica e molecolare delle componenti cellulari (hA-MSCs e WBCs) in seguito a trattamento di co-cultura *in vitro*.

PUBBLICAZIONI

- Pampalone, M., Corrao, S., Amico, G., Vitale, G., Alduino, R., Conaldi, P. G., & Pietrosi, G. (2021). Human Amnion-Derived Mesenchymal Stromal Cells in Cirrhotic Patients with Refractory Ascites: A Possible Anti-Inflammatory Therapy for Preventing Spontaneous Bacterial Peritonitis. *Stem cell reviews and reports*, 17(3), 981-998. <https://doi.org/10.1007/s12015-020-10104-8>
- Miceli, V., Bertani, A., Chinnici, C. M., Bulati, M., Pampalone, M., Amico, G., Carcione, C., Schmelzer, E., Gerlach, J. C., & Conaldi, P. G. (2021). 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. *International journal of molecular sciences*, 22(2), 510. <https://doi.org/10.3390/ijms22020510>
- Lo Nigro, A., Gallo, A., Bulati, M., Vitale, G., Pains, D. S., Pampalone, M., Galvagno, D., Conaldi, P. G., & Miceli, V. (2021). Amnion-Derived Mesenchymal Stromal/Stem Cell Paracrine Signals Potentiate Human Liver Organoid Differentiation: Translational Implications for Liver Regeneration. *Frontiers in medicine*, 8, 746298. <https://doi.org/10.3389/fmed.2021.746298>



BIOINGEGNERIA ED INGEGNERIA DEI TESSUTI

La terza macro-area di interesse, **Bioingegneria ed Ingegneria dei tessuti** è focalizzata alla simulazione di sistemi fisiologici, lo studio di biomateriali e tessuti ingegnerizzati per migliorare la comprensione dei meccanismi patologici e di rigenerazione dei tessuti, e per lo sviluppo di nuove soluzioni terapeutiche. I ricercatori in questa macro-area possono progettare, sviluppare ed eseguire la convalida preclinica di organi e dispositivi impiantabili di nuova generazione, in particolare in campo cardiovascolare.

Nel 2021 sono stati raggiunti risultati significativi sia in termini di ricerca di base sia in termini di applicazioni dirette per i pazienti. In particolare, sono stati studiati nuovi approcci per caratterizzare i tessuti biologici e i biomateriali e la fabbricazione di scaffold.

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

Sviluppo di bio-adesivi non tossici per ambienti acquosi

Caterina Alfano, PhD

Sviluppo di una valvola cardiaca transcateretere innovativa

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

Sviluppo di sensori elettrochimici innovativi per il rilevamento di biomarcatori

Chiara Cipollina, 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

Sviluppo di bio-adesivi non tossici per ambienti acquosi

Caterina Alfano, PhD
calfano@fondazionerimed.com

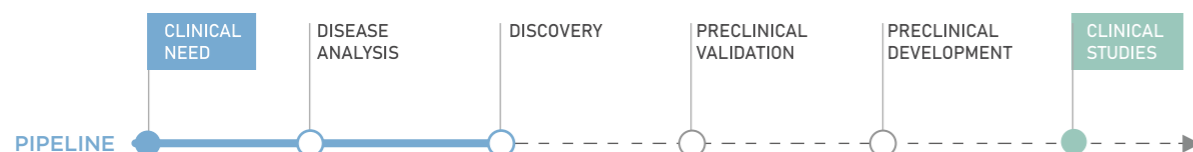


COLLABORAZIONI

- UK Dementia Research Institute (UK DRI) - King's College London, Londra, Regno Unito
- Istituto di Biofisica (IBF) – Consiglio Nazionale delle Ricerche (CNR), Palermo, Italia
- European Synchrotron Radiation Facility (ESRF), Grenoble, France

AREA TERAPEUTICA

Insufficienze d'organo



BREVE DESCRIZIONE

Le cozze sono in grado di aderire fortemente a superfici solide in ambiente marino attraverso la secrezione di un'appendice fibrosa a base di proteine chiamata bisso, formata da fasci di fibre intrecciate tra loro. Ciascun filamento termina con una placca ricca di proteine, contenente le mussel foot proteins (mfps) caratterizzate da proprietà adesive, che fungono da collante resistente all'acqua e consentono alle cozze di ancorarsi saldamente a diversi substrati. Una particolarità delle mfps è la presenza nella loro sequenza dell'amminoacido catecolico 3,4-diidrossi-L-fenilalanina (DOPA), un derivato della tirosina ottenuto per modificazione post-traduzionale in grado di legarsi a un'ampia varietà di substrati. Tuttavia, sta diventando sempre più chiaro che la presenza di DOPA non è necessaria per produrre una forte adesione in ambiente acquoso, e le proteine

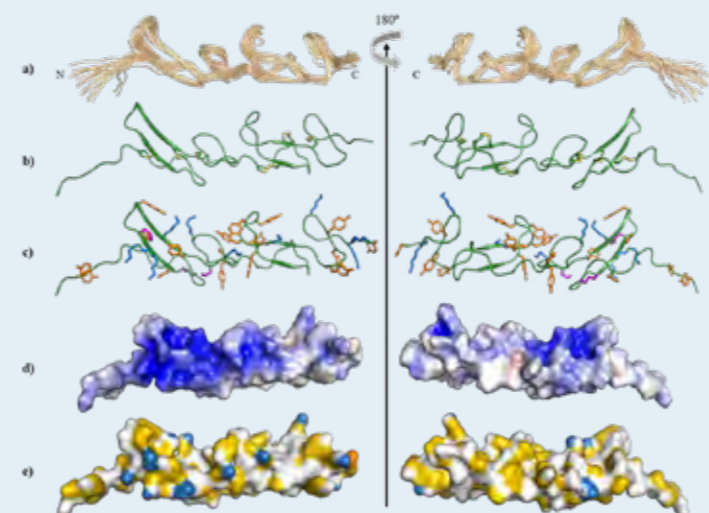
DOPAminate non hanno proprietà adesive superiori rispetto alle corrispondenti versioni non DOPAminate. Abbiamo precedentemente caratterizzato Pvfp-5 β , una delle proteine mfp della cozza verde asiatica *Perna viridis*. Pvfp-5 β è la prima ad essere secreta e a stabilire l'interazione con il substrato marino, e ciò rende questa proteina un sistema di particolare interesse. Abbiamo dimostrato che è possibile produrre Pvfp-5 β ricombinante in batteri e che Pvfp-5 β ha bassa tossicità e proprietà adesive intrinseche anche in assenza di DOPA. Abbiamo poi fatto un altro importante passo avanti verso la possibilità di comprendere i determinanti strutturali delle proprietà adesive di Pvfp-5 β risolvendo la sua struttura 3D in soluzione e caratterizzando la dinamica della proteina, in vista del suo utilizzo per applicazioni biologiche e biotecnologiche.

IMPATTO

Lo sviluppo di nuovi adesivi di origine naturale ha un grande impatto in settori quali l'ingegneria dei tessuti, l'impianto di dispositivi medici, la medicina rigenerativa e la chirurgia. Infatti, ci sono situazioni in cui tecniche più tradizionali come la sutura sono impraticabili e l'uso di adesivi tissutali diventa particolarmente cruciale. Negli ultimi 30 anni, i bioadesivi hanno cambiato il processo chirurgico con crescente importanza e rapido sviluppo. Infatti, i bioadesivi sono meno invasivi, hanno meno possibilità di danneggiare i tessuti, una migliore immobilizzazione e la capacità di favorire la guarigione delle ferite attraverso diversi meccanismi, grazie alle loro proprietà antibatteriche, antinfiammatorie e antiossidanti. La grande sfida nello sviluppo di nuove molecole bioadesive è trovare molecole in grado di espletare la loro funzione e di far aderire tessuti tra loro in modo efficiente in ambienti acquosi. In natura diversi organismi marini, come le cozze, riescono ad aderire così saldamente alle superfici bagnate da resistere alla forza delle maree e delle onde. Le proteine bio-ispirate da animali sessili con proprietà adesive in ambienti acquosi sono quindi molto attraenti, anche perché sono potenzialmente biodegradabili, solitamente non tossiche per il corpo umano e non suscitano facilmente una forte risposta immunitaria. La piena comprensione dei meccanismi adesivi che coinvolgono le mfp è quindi fondamentale per lo sviluppo di biomateriali con proprietà che potrebbero essere sfruttate non solo nella medicina rigenerativa e nell'ingegneria dei tessuti ma anche nella scienza dei materiali.

RISULTATI RAGGIUNTI NEL 2021

Abbiamo risolto la struttura NMR in soluzione di Pvfp-5 β , una delle mfp secrete dalla cozza verde asiatica *Perna viridis*. Tra le proteine prodotte da questo organismo, che comprendono anche Pvfp-3 α e Pvfp-6, la Pvfp-5 β è la prima ad essere secreta e a stabilire un'interazione con il substrato marino, e ciò rende questa proteina un sistema di particolare interesse. La struttura della Pvfp-5 β , altamente



rigida ad eccezione di alcuni residui affetti da lenti moti locali nella scala temporale dei μ s-ms, è ricca di β -strand che formano due motivi EGF-like in tandem. La rigidità complessiva, favorita dalla presenza di ponti disolfuro, potrebbe essere la caratteristica strutturale principale per svolgere la funzione adesiva, favorendo l'esposizione persistente dei residui di tirosina e lisina al solvente, massimizzando l'interazione con superfici e/o altre proteine. Abbiamo inoltre generato modelli di docking di tutte e tre le possibili interazioni proteina-proteina: Pvfp-5 β /Pvfp-5 β , Pvfp-5 β /Pvfp-3 α e Pvfp-5 β /Pvfp-6. Questi studi preliminari, hanno permesso di identificare le superfici e il tipo di interazioni (cationi- π , π - π , legami idrogeno) che coinvolgono le tre proteine durante il processo di coacervazione che avviene nell'adesione dei mitili. Nel complesso, il nostro lavoro costituisce un tentativo strutturale diretto di comprendere il riconoscimento molecolare delle proteine dei mitili a livello molecolare.

OBIETTIVI PER IL 2022

Rimangono aperte diverse domande sul processo di coacervazione nell'adesione dei mitili: non conosciamo, ad esempio, la stechiometria complessa o il contributo relativo delle diverse componenti, né la cinetica precisa degli eventi che possono aver luogo. Inoltre non sappiamo esattamente come la presenza di DOPA possa influenzare la modalità di legame. Sarà quindi necessario affrontare queste importanti questioni aperte. Il nostro prossimo passo consisterà nello studio del processo di autoassemblaggio di Pvfp-5 β e, parallelamente, esprimere e purificare la Pvfp-3 α per determinare la sua struttura 3D in soluzione e per ottenere evidenze sperimentali della modalità di interazione con Pvfp-5 β . A tal fine verranno utilizzate diverse tecniche biofisiche come Dicroismo Circolare, Spettrometria di Massa, Risonanza Magnetica Nucleare e Calorimetria di Titolazione Isotermica.

CONFERENZE

- CCPNMR Conference, August, 2021, *online*
- Workshop on Integrative modelling of biomolecular complexes with HADDOCK, 2021, *online*

PUBBLICAZIONI

- Morando M.A., Venturella F., Monaca E., Sabbatella R., Rosa Passantino, Pastore A., Alfano C. (2021) The solution structure of recombinant Pvfp-5 β reveals new insights into mussel adhesion. *Comm Biol*. Submitted

Struttura NMR in soluzione di Pvfp-5 β :

- Sovrapposizione delle 20 strutture a più bassa energia.
- Rappresentazione cartoon della struttura a più bassa energia con ponti disolfuro in giallo.
- Rappresentazione cartoon della struttura a più bassa energia con tirosine, lisine e arginine evidenziate rispettivamente in arancione, blu e magenta.
- Potenziale elettrostatico superficiale con residui acidi in rosso e basici in blu.
- Superficie idrofobica.

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

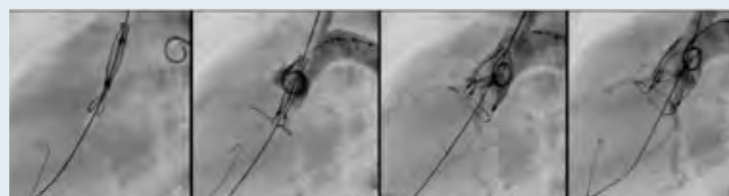
- Insufficienze d'organo
- Patologie dell'invecchiamento



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 di una nuova valvola aortica protesica adatta per l'impianto TAVI, che supererebbe i principali limiti sperimentati delle soluzioni attualmente disponibili.



Sequenza di impianto del dispositivo

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 2021

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



Immagine della valvola transcateretere TRISKELE

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.

Nel 2020 la Fondazione Ri.MED ha ottenuto la riassegnazione della proprietà intellettuale del *delivery system* del dispositivo (il cui brevetto è già concesso sia in Europa che negli USA) e la sua versione per impianto transcateretere mitrale, acquisendo totale libertà operativa per i futuri sviluppi del dispositivo.

OBIETTIVI PER IL 2022

Si prevede che nel corso del 2021 verrà completata l'ottimizzazione ed industrializzazione del dispositivo. Il *delivery system* sarà riprogettato ed adattato alla produzione industriale, e si procederà alla fase di valutazione *in vivo*. La collaborazione con i partner sarà funzionale anche alla verifica degli aspetti non clinici (durata a magazzino, imballaggio, accessori, ecc.), la compilazione dei dossier di progetto e l'organizzazione della fase clinica per concretizzare con successo il trasferimento tecnologico. Inoltre, il gruppo di bioingegneria collaborerà all'estensione dei principi di funzionamento della TRISKELE ad altri distretti valvolari, definendo con i partner un nuovo dispositivo adatto alla sostituzione transcateretere della valvola mitrale.

PROPRIETÀ INTELLETTUALE

- Seifalian, A. M., Zervides, C., Burriesci, G. (2019) Heart Valve Prosthesis. Patent US10357358 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 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

PRODOTTI: **Biomarcatori - Dispositivi biomedicali e Organi artificiali**

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

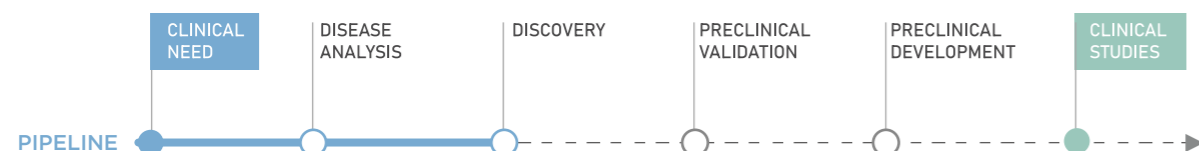
Gaetano Burriesci, PhD
gburriesci@fondazionerimed.com

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



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 patient specific 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. Inoltre, tali modelli sono stati utilizzati per investigare il fenomeno dell'inversione dell'appendice atriale, riportata come rara complicanza di procedure chirurgiche di routine, come l'impianto di LVAD (Left Ventricular Assist Device) o operazioni di bypass polmonare.

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, su modelli estratti da paziente. 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.

Riguardo l'inversione dell'appendice, questo studio rappresenta la prima analisi sistematica del fenomeno. I suoi risultati stanno fornendo importanti indicazioni per individuarne le cause e fornire ai clinici utili informazioni sia per prevenirlo che per intervenire tempestivamente per riportare il cuore in condizioni fisiologiche.

RISULTATI RAGGIUNTI NEL 2021

Al fine di esaminare l'effetto delle alterazioni prodotte dalla FA, sono stati generati quattro modelli patient specific dell'atrio sinistro per descrivere condizioni di contrattilità regolare e fibrillante, mediante applicazione della motilità muscolare alle pareti dell'appendice attraverso l'impostazione di una contrazione virtuale. Questa è calibrata su valutazioni cliniche di riempimento e svuotamento della camera, e sincronizzata con condizioni al

contorno imposte al fluido per replicare la pressione atriale fisiologica tipica delle condizioni sane e fibrillanti. Lo studio ha dimostrato che l'emodinamica nell'appendice atriale è strettamente influenzata dalla fase di contrazione attiva, il cui contributo risulta sostanzialmente più marcato rispetto all'effetto della specifica morfologia della camera.

Si è inoltre simulata l'inversione delle quattro appendici, applicando una depressione variabile all'interno delle camere. In questo caso, i risultati indicano un ruolo dominante della morfologia, suggerendo nuove manovre percutanee per il ripristino delle condizioni fisiologiche.

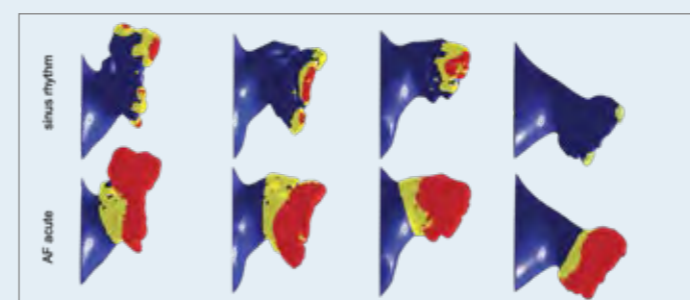
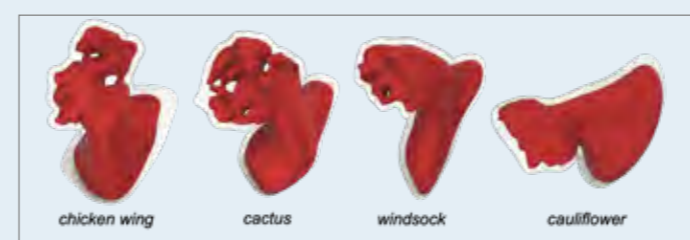
OBIETTIVI PER IL 2022

Il passo successivo richiederà un ulteriore affinamento dei modelli e la verifica dell'efficacia dell'attuale classificazione, basata sulla morfologia globale dell'appendice, piuttosto che sulle caratteristiche topologiche locali che la nostra analisi indica come più rilevanti. Quindi saranno identificati parametri descrittivi del fenomeno più rilevanti, in grado di supportare un'efficace stratificazione del rischio tromboembolico nei pazienti con FA.

Riguardo il fenomeno dell'inversione, estenderemo lo studio ad altri modelli patient specific, al fine di chiarire i fattori morfologici che favoriscono il fenomeno, con particolare attenzione al ruolo delle trabecole, la cui distribuzione e dimensione è risultata molto variabile da soggetto a soggetto.

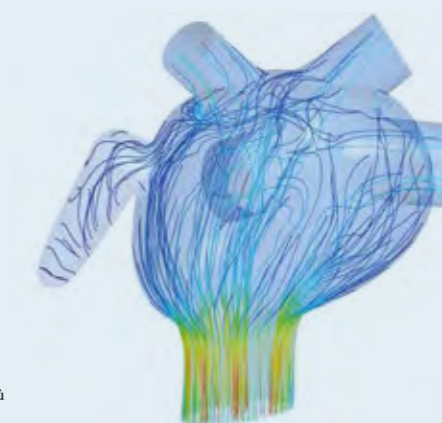
PUBBLICAZIONI

Vella, D., Monteleone, A., Musotto, G., Bosi, G.M., Burriesci, G. (2021) Effect of the Alterations in Contractility and Morphology Produced by Atrial Fibrillation on the Thrombosis Potential of the Left Atrial Appendage. *Front. Bioeng. Biotechnol.* 9: 586041. doi:10.3389/fbioe.2021.586041



Modelli patient specific impostati ed analizzati nello studio in oggetto.

Regioni dell'appendice atriale che il nostro studio indica a più alto rischio di trombosi per i diversi pazienti, in condizioni di ritmo cardiaco sano (in alto) ed in condizioni di fibrillazione (in basso).



Mappa 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



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 circolatorio 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 sempre 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

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 in modo realistico l'interazione multifisica tra flusso sanguigno e trombi. Inoltre, l'accoppiamento con un approccio FSI permette di studiare la formazione del trombo mediante lo sviluppo di forze tra particelle. La concentrazione delle diverse specie bio-chimiche coinvolte nella cascata coagulativa può essere descritta attraverso equazioni di convezione-diffusione.

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

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 una piattaforma numerica 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 fornire 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 2021

Tra i risultati raggiunti nel corso del 2021, è opportuno sottolineare l'implementazione ed integrazione di diversi moduli nel codice open-source Panormus (sviluppato presso l'Università degli Studi di Palermo). È stato introdotto un modulo riguardante la meccanica strutturale, che consente di rappresentare il solido e la sua risposta meccanica. Tale modello è stato accoppiato con la dinamica dei fluidi descritta con il metodo SPH, realizzando un approccio FSI partizionato. Inoltre, è stato realizzato un approccio FSI monolitico che permette la modellazione della formazione del trombo e l'interazione di questo con il flusso sanguigno. Il processo della trombosi è descritto utilizzando le principali reazioni enzimatiche che attivano la cascata coagulativa. Le specie biochimiche considerate nel modello sono la trombina, la fibrina, le piastrine attive e quelle legate. Il modello prevede la trasformazione, in determinate condizioni, di particelle fluide in solide attraverso l'introduzione legami molla.

I nuovi moduli sviluppati sono stati validati utilizzando opportuni casi di riferimento presenti in letteratura. La complessità del fenomeno della trombosi è amplificata nelle regioni dove il fluido è influenzato dalla deformazione delle strutture immerse che interagiscono con un flusso sanguigno pulsatile. L'approccio FSI monolitico è stato pertanto esteso alla modellazione della valvola aortica, in modo da valutare l'effetto della dinamica dei lembi sull'emodinamica.

OBIETTIVI PER IL 2022

I passi programmati per il progetto di ricerca riguarderanno l'approfondimento dei moduli già implementati nel codice SPH per applicazioni nel campo della bioingegneria. A tal fine verranno approfonditi ed arricchiti gli aspetti riguardanti l'interazione fluido-struttura e la modellazione della formazione, crescita e dissoluzione del trombo. Per la descrizione della parte strutturale verranno introdotti legami costitutivi non lineari che caratterizzano i tessuti biologici, oltre che una descrizione del comportamento anisotropo di tali materiali. Relativamente al modello del trombo si prevede di introdurre la modellazione di due diverse tipologie di coagulo, quello derivante dall'adesione piastrinica e quello indotto dalle fibrine. Si prevede inoltre di introdurre la descrizione di agenti anticoagulanti ed antiaggreganti. Il modello quindi potrà essere applicato per rappresentare situazioni reali più complesse come malfunzionamenti di valvole cardiache, stenosi arteriose, aneurisma cerebrale o dell'aorta addominale, così come per una valutazione diagnostica del rischio trombo-embolico nell'appendice atriale.

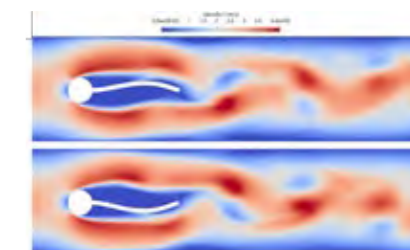


Figura: Caso test di riferimento per la validazione dell'approccio FSI partizionato: interazione tra una trave elastica e un flusso fluido incomprimibile laminare

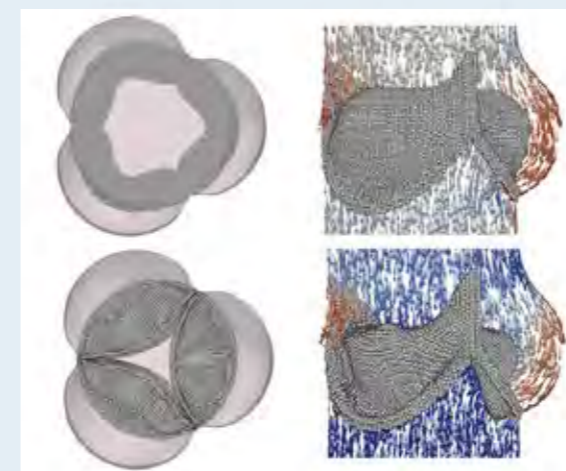


Figura: Applicazione del modello monolitico FSI per la descrizione della dinamica della valvola aortica (lembi rappresentati con punti in grigio).



Figura: Formazione ed evoluzione nel tempo di un coagulo di sangue (colorato in marrone).

PRODOTTI: Dispositivi biomedicali e Organi artificiali

Caratterizzazione termomeccanica di biomateriali superelastici Ni-Ti

Gaetano Burriesci, PhD
gburriesci@fondazioneirimed.com

COLLABORAZIONI

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

AREA TERAPEUTICA

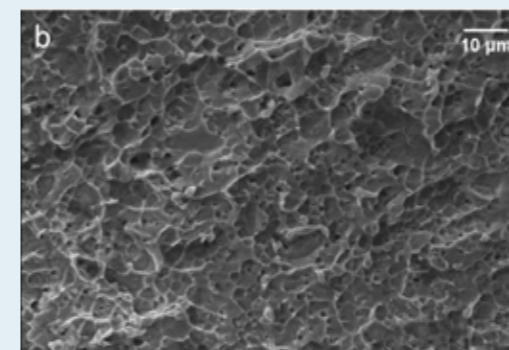
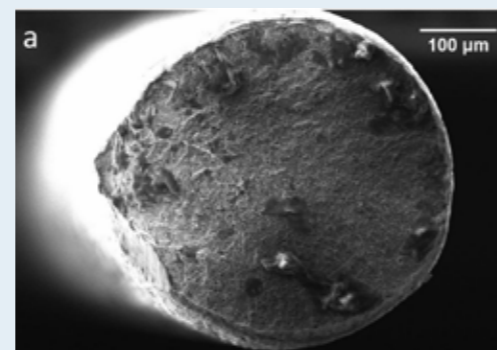
- Insufficienze d'organo
- Patologie dell'invecchiamento



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 singolare risposta meccanica è ancora poco chiaro e, pertanto, non sfruttato appieno. Il comportamento superelastico è causato da una trasformazione di fase reversibile indotta da tensioni meccaniche, che determina una riconfigurazione cristallina dalla struttura austenitica a quella martensitica. Tale processo è associato a rilascio/assorbimento di calore. In questo studio vengono sfruttati questi effetti termici per raggiungere una migliore comprensione del fenomeno e una caratterizzazione più accurata del materiale.

A tale progetto partecipano l'Ing. Sofia Di Leonardo e l'Ing. Valentina Pinto (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.

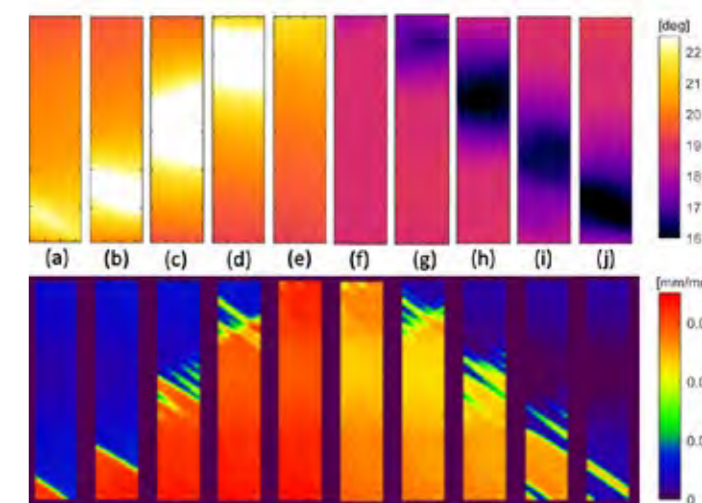
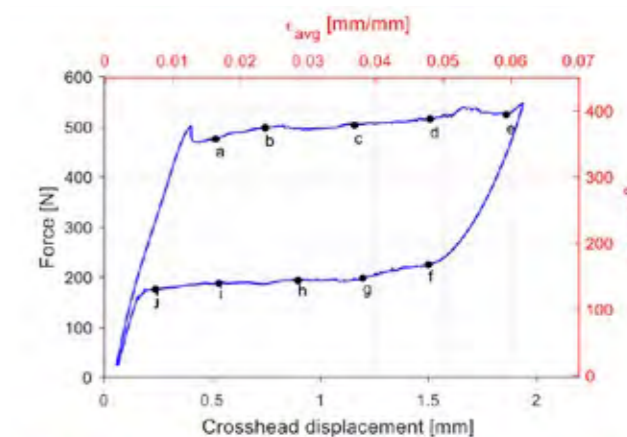
RISULTATI RAGGIUNTI NEL 2021

Il complesso comportamento termomeccanico del nitinol è stato investigato tramite l'implementazione combinata di tecniche a campo interno, al fine di identificare le caratteristiche meccaniche locali del materiale. In particolare, la tecnica di Digital Image Correlation (DIC), tecnica ottica innovativa che consente di misurare lo stato di deformazione, è stata integrata con analisi termoeastiche (TSA). Quest'ultima consente di rilevare, tramite l'utilizzo di termocamere a infrarossi, le variazioni di temperatura di un componente sottoposto a carichi ciclici e di individuarne lo stato di tensione superficiale mediante l'analisi del segnale termico nel campo delle frequenze. L'applicazione combinata delle tecniche DIC e TSA ha consentito di appurare la complessa risposta locale del materiale, mettendo in luce l'insorgenza di momenti flettenti spuri causati dalla disomogeneità del provino sotto carico e l'inadeguatezza delle comuni formulazioni termoelastiche.

OBIETTIVI PER IL 2022

In futuro, lo studio si focalizzerà sull'interpretazione delle informazioni derivanti dal segnale di fase dell'effetto termoelastico, al fine di identificare le formulazioni più idonee alla descrizione

ne del Nitinol. Ciò consentirà di ottenere mappe di sollecitazioni a campo intero, a partire dalle mappe di temperatura e deformazione. Queste faciliteranno l'individuazione ed analisi delle regioni sottoposte a sollecitazioni meccaniche critiche di componenti complessi, fornendo uno strumento indispensabile per l'analisi sperimentale dei prototipi di protesi cardiovascolari e per la predisposizione di opportuni modelli numerici del materiale nell'ambito di analisi FEM.



Curva forza-spostamento / tensione-deformazione relativa ad un test quasi statico, (in alto) e mappe termiche (al centro) e di deformazione (in basso) riferite a alcuni punti selezionati lungo i plateau di trasformazione di fase superiore (a-e) ed inferiore (f-i).

PUBBLICAZIONI

S. Di Leonardo, R. Cappello, G. Burriesci, G. Pitarresi, Investigation of the Thermomechanical Response of Cyclically Loaded NiTi Alloys by Means of Temperature Frequency Domain Analyses, Materials (Basel). 14 (2021) 7866. <https://doi.org/10.3390/ma14247866>.

Sviluppo di sensori elettrochimici innovativi per il rilevamento di biomarcatori

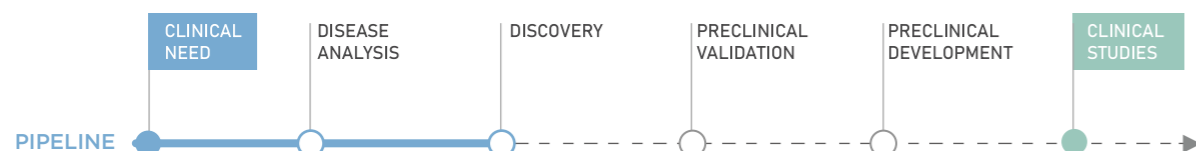
Chiara Cipollina, PhD
ccipollina@fondazionerimed.com

COLLABORAZIONI

- Istituto per la Ricerca e l'Innovazione Biomedica (IRIB) - CNR, Palermo, Italia
- Istituto di Farmacologia Traslazionale (IFT) - CNR, Palermo, Italia
- Dipartimento di Ingegneria - Università degli Studi di Palermo, Palermo, Italia

AREA TERAPEUTICA

Patologie dell'invecchiamento



Sensore Nanostrutturato per Stress Ossidativo



Il Progetto n. 082651290364 - "Se.N.S.O.", CUP G78I18000930007 è stato cofinanziato dalla Regione Siciliana, Assessorato delle Attività Produttive nell'ambito dell'Azione 1.1.5 "Sostegno all'avanzamento tecnologico delle imprese attraverso il finanziamento di linee pilota e azioni di validazione precoce dei prodotti e di dimostrazione su larga scala" del PO FESR Sicilia 2014/2020."

BREVE DESCRIZIONE

Negli ultimi anni, sta emergendo un interesse crescente per lo sviluppo di sensori elettrochimici nanostrutturati per il rilevamento quantitativo di biomarcatori in fluidi biologici. In un sensore elettrochimico, il segnale è generato dalle reazioni redox che avvengono sulla superficie dell'elettrodo. Le tecniche elettrochimiche presentano numerosi vantaggi rispetto agli attuali approcci quali basso costo, facilità d'uso, anche per personale non qualificato, elevata sensibilità e tempi di risposta rapidi. Recentemente sono stati proposti anche dispositivi indossabili, implementati con tecnologia wireless per la trasduzione del segnale, per la rilevazione diretta e non invasiva di biomarcatori in fluidi biologici (es. sudore, saliva e condensato dell'esalato bronchiale). Questo può rappresentare un

valido approccio in telemedicina per il monitoraggio della progressione della malattia e della risposta alla terapia. In collaborazione con il Dipartimento di Ingegneria (Università di Palermo) e l'Istituto IFT-CNR, stiamo attualmente lavorando allo sviluppo e alla validazione in condizioni operative reali di un sensore elettrochimico nanostrutturato per la quantificazione del perossido di idrogeno (marker di stress ossidativo) rilasciato dalle cellule. Questa attività è stata finanziata attraverso il bando P.O. FESR Sicilia 2014/2020 - progetto Se.N.S.O. Stiamo inoltre lavorando allo sviluppo di un biosensore innovativo per la rilevazione di biomarcatori dell'asma in fluidi biologici (progetto di dottorato industriale finanziato dal bando PON R&I, 2014-2020).

IMPATTO

Lo sviluppo di approcci di medicina personalizzata richiede continue innovazioni tecnologiche che aiutino a definire con precisione le caratteristiche del paziente e a monitorare la risposta alla terapia. In questo scenario, lo sviluppo di nuovi biosensori in grado di quantificare biomarcatori in fluidi biologici porterà progressi nel campo della medicina personalizzata e della telemedicina.

L'impatto di questo progetto va oltre l'ambito delle malattie infiammatorie croniche delle vie aeree. Lo stress ossidativo, infatti, è una condizione che caratterizza tutte le malattie infiammatorie croniche e le malattie dell'invecchiamento. Inoltre, la tecnologia che svilupperemo per la rilevazione dei biomarcatori dell'asma, potrà essere facilmente estesa a qualsiasi altro biomarcatore di interesse.

RISULTATI RAGGIUNTI NEL 2021

Nel corso del 2021 abbiamo completato la messa a punto di tutti i saggi biochimici e dei modelli sperimentali necessari per la validazione del sensore elettrochimico per perossido di idrogeno sviluppato dai colleghi del Dipartimento di Ingegneria nell'ambito del progetto Se.N.S.O. Saggi preliminari di validazione in condizioni operative reali hanno confermato che il sensore sviluppato è in grado di quantificare il rilascio di perossido di idrogeno dai macrofagi umani e dalle cellule epiteliali bronchiali (sia cellule primarie che linee cellulari). Fig. 1. Inoltre, abbiamo messo a punto la piattaforma sperimentale necessaria per lo sviluppo e la validazione di immunosensori elettrochimici per il rilevamento di biomarcatori dell'asma. Fig. 2. Nel 2021 abbiamo ottenuto un nuovo finanziamento per un progetto dal titolo "Sensomar - sensore integrato in una mascherina" nell'ambito del bando FISR 2020 (56K EUR). Per approfondimenti pag. 33: "Ri.MED IN PRIMA LINEA CONTRO IL COVID-19"

OBIETTIVI PER IL 2022

Nel corso del 2022, seguendo la timeline del progetto Se.N.S.O., proseguiremo con la validazione del sensore per il rilevamento del perossido di idrogeno valutandone le prestazioni in diverse condizioni sperimentali e utilizzando diversi modelli cellulari. Il rilascio di perossido di idrogeno verrà correlato con i parametri di infiammazione e danno cellulare. Queste attività porteranno allo sviluppo e alla validazione di un primo dispositivo portatile che sarà fabbricato in collaborazione con i nostri partner industriali. Inoltre, durante il 2022, miriamo a completare lo sviluppo proof-of-concept di un immunosensore nanostrutturato per la quantificazione di un biomarcatore selezionato dell'asma nei fluidi biologici. Infine, condurremo le attività previste dal progetto Sensomar che porteranno alla creazione di un sensore per il perossido di idrogeno integrato in una mascherina.

CONFERENZE

- *Electrochemical sensor for evaluating oxidative stress in airway epithelial cells*, Di Vincenzo S, Patella B, Ferraro, Bollaci L, Buscetta M, Cipollina C, Aiello G, Inguanta R, Pace E. European Respiratory Society (ERS) Congress 2021, 5-8 September 2021, virtual. Published on European Respiratory Journal 58 (suppl 65) PA3704; DOI: 10.1183/13993003.congress-2021.PA3704
- *Electrochemical quantification of oxidative stress in airway epithelial cells*, Patella B, Di Vincenzo S, Ferraro M, Buscetta M, Pace E, Cipollina C, Aiello G, Bollaci L, Inguanta R. 72nd Annual Meeting of the International Society of Electrochemistry, 29 August - 03 September 2021, Jeju Island, Korea

PUBBLICAZIONI

Patella B, Buscetta M, Di Vincenzo S, Ferraro M, Aiello G, Sunseri C, Pace E, Inguanta R, Cipollina C (2021) Electrochemical sensor based on rGO/Au nanoparticles for monitoring H₂O₂ released by human macrophages. *Sensors and Actuators B: Chemical*, 327:128901. <https://doi.org/10.1016/j.snb.2020.128901>.

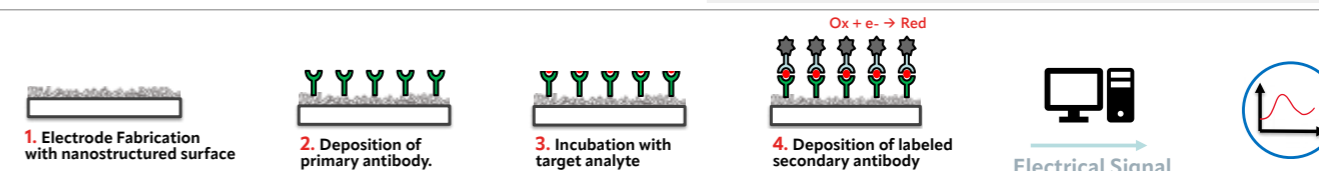


Fig. 2 Nanostructured electrochemical sensor for disease biomarkers

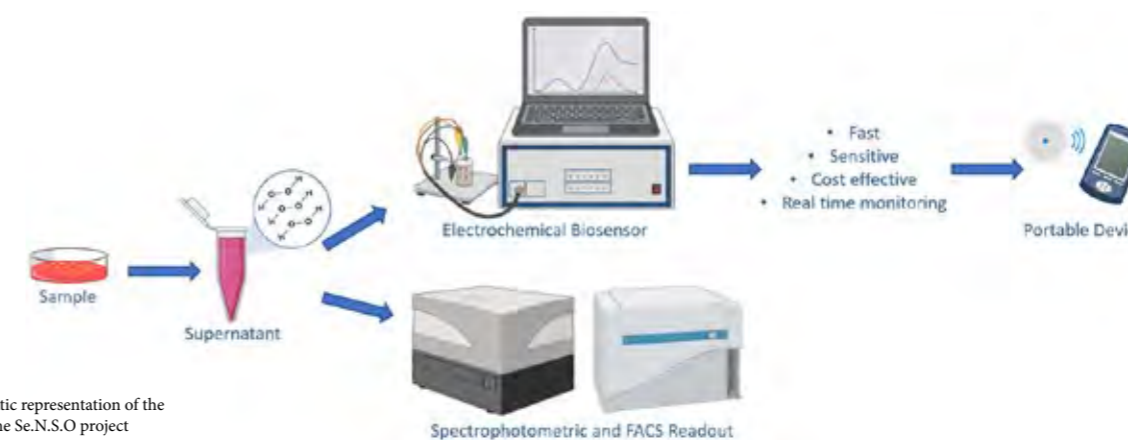


Fig. 1 Schematic representation of the workflow of the Se.N.S.O. project

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

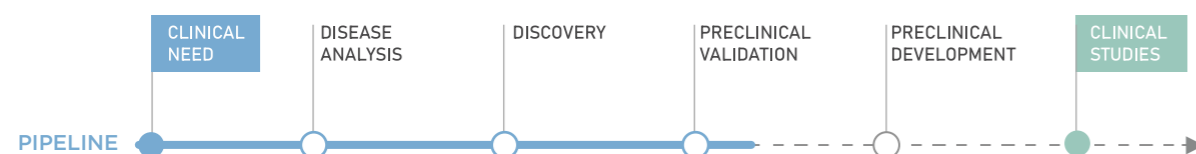
Antonio D'Amore, PhD
adamore@fondazionerimed.com

COLLABORAZIONI

- Politecnico di Milano, Milano, Italia
- University of Pittsburgh, Pittsburgh, Stati Uniti
- Telea Biotech – Tissue Engineering Biomedical Technologies, Italy

AREA TERAPEUTICA

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



BREVE DESCRIZIONE

Numerosi studi hanno evidenziato che il rimodellamento e lo sviluppo dei tessuti biologici è regolato dalla risposta cellulare all'azione delle forze meccaniche esterne. Le forze meccaniche sono ubiquitarie *in vivo* e regolano funzioni biologiche chiave, come la migrazione cellulare, il profilo fenotipico, l'adesione alla matrice extracellulare (ECM) e la sua produzione. Sebbene siano state formulate ipotesi sulla risposta cellulare a diversi tipi di stimoli meccanici *in vivo*, la comprensione di questi meccanismi da un punto di vista bioingegneristico è ancora poco studiata. La linea di ricerca BE-ECM, in correlazione con le linee NET-IBA e NET-MTG, mira alla creazione di modelli *in vivo* che consentano lo studio dell'attività cellulare, della degradazione del biomateriale e della crescita di tessuto.

In questo progetto è coinvolta la Dr. Arianna Adamo, expert scientist in meccanobiologia.



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 micro-integrated 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 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 meccanobiologia dei biomateriali progettati e consente di verificare, su sistemi semplificati, l'efficacia di diverse strategie di ingegneria di tessuto. Esempi di tali strategie includono: regimi di condizionamento per accelerare la crescita tessutale, modulazione dei profili di degradazione, orientare o influenzare la differenziazione cellulare.

RISULTATI RAGGIUNTI NEL 2021

La linea di ricerca BE-ECM è stata sviluppata a partire dal 2009 dal PI ed i suoi collaboratori. BE-ECM prevede l'impiego di bioreattori per mimare l'ambiente nativo e comprendere i processi cellulari. Scaffold polimerici di natura fibrosa micro integrati con cellule sono prodotti in diverse forme per studiare un ampio spettro di applicazioni. In particolare, BE-ECM è progettata a supporto dello sviluppo di valvole cardiache ingegnerizzate (TEHV), vasi sanguigni ingegnerizzati (TEVG), patch cardiaco (TECP) e chordae tendineae bioingegnerizzate (BECT). L'obiettivo raggiunto nel 2021 è stato quello di investigare i meccanismi cellulari che sottendono alla trasduzione degli stimoli *in vivo* utilizzando sistemi semplificati di sintesi di matrice extracellulare *in vitro*. 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 l'apparato di condizionamento meccanico di corde tendinee;
- implementare l'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.

OBIETTIVI PER IL 2022

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;
- valutare le curve di degradazione di nuovi prototipi di valvole atrioventricolari ingegnerizzate sviluppate nella linea di ricerca TEHV;
- valutare gli 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.

CONFERENZE

- *Mandrel-less fabrication of biomimetic microfiber wires for soft tissue engineering applications* - Arianna Adamo, Joseph G. Bartolacci, Marco G. Traina, Seungil Kim, Simon C. Watkins, William R. Wagner, Stephen F. Badylak, Antonio D'Amore. Congresso Nazionale Biomateriali 2021, Luglio, 2021, Lecce (Italia)
- *A continuous microfiber wire mandrel-less biofabrication for soft tissue engineering applications* - Arianna Adamo, Joseph B. Bartolacci, Marco Traina, William R. Wagner, Antonio D'Amore. 6th World Congress 2021 Tissue Engineering and Regenerative Medicine International Society (TERMIS), Novembre, 2021, Maastricht (Olanda)
- *Biomimetic engineered chordae tendineae generated with mandrel-less fabrication* - Arianna Adamo, Giovanni Spiaggia, William R. Wagner, Antonio D'Amore. 6th World Congress 2021 Tissue Engineering and Regenerative Medicine International Society (TERMIS), Novembre, 2021, Maastricht (Olanda)

Lezioni su invito:

- *Bioinspired polymer processing: how improved control over biomaterial structure-function can facilitate translation*, invited seminar for the Department of Physics and Chemistry Emilio Segrè, University of Palermo, Italy, April 19th 2021.

PUBBLICAZIONI

Arianna Adamo, Joseph G. Bartolacci, Marco G. Traina, Seungil Kim, Antonio Pantano, Giulio Ghersi, Simon C. Watkins, William R. Wagner, Stephen F. Badylak, and Antonio D'Amore "Continuous microfiber wire mandrel-less biofabrication for soft tissue engineering applications." Submitted to *Advanced Healthcare Materials* (IF 9.933)

PROPRIETÀ INTELLETTUALE

US patent application PCT/US21/054767 filed on 10/2021, topic: bioprocessing methods, title: "Hybrid micro molding-fiber deposition substrate processing for cell biology manipulation and local anisotropy". Arianna Adamo, Pietro Terranova, William R. Wagner, Antonio D'Amore.

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

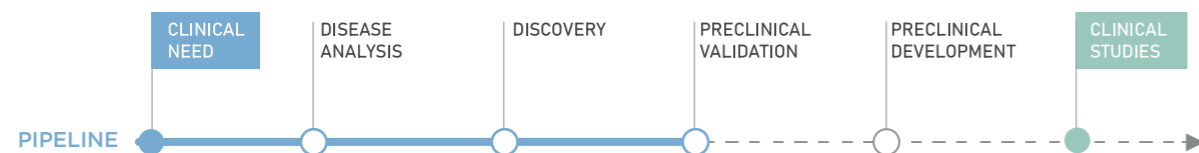
Antonio D'Amore, PhD
adamore@fondazionerimed.com

COLLABORAZIONI

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

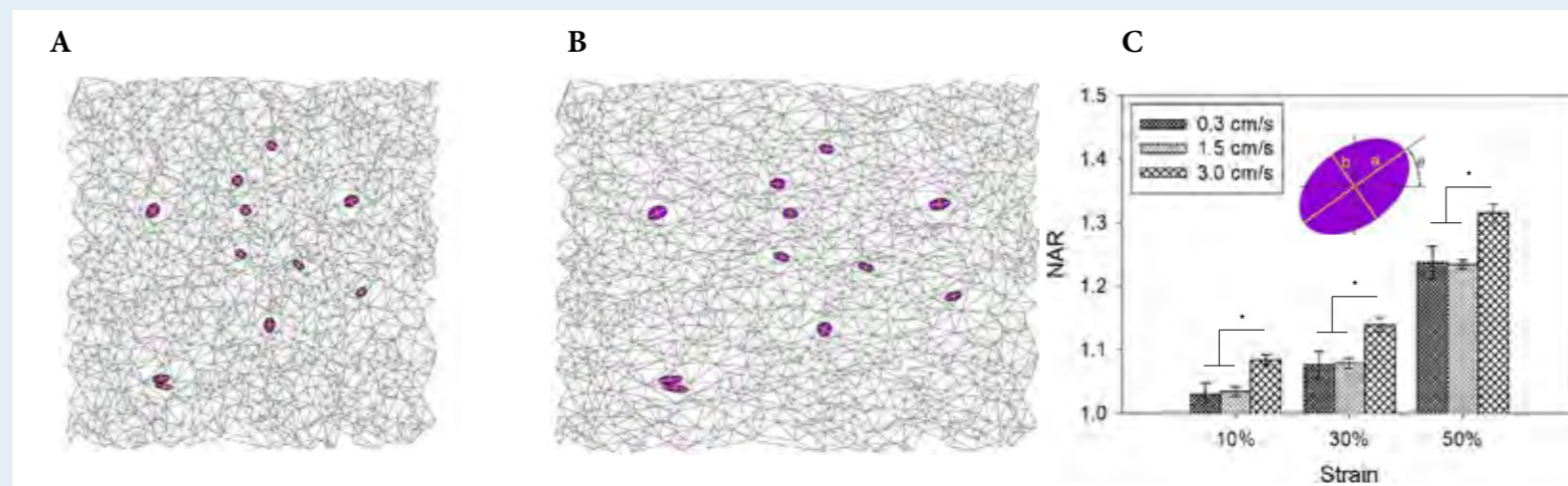
AREA TERAPEUTICA

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



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 stimoli meccanici e topologici. Questa linea di ricerca cerca di dare nuove risposte su questi tre differenti fronti introducendo e perfezionando modelli strutturali deterministici di tessuti ingegnerizzati e nativi.



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

IMPATTO

Questa ricerca ha potenzialmente impatto sul fronte della bio-meccanica computazionale e della 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 i ingegnerizzati, applicazioni: TEHV, TEVG, TECP;
- creazione di strumenti numerici di indagine per comprendere i processi di invecchiamento di tessuto alla scala della matrice extracellulare;
- creazione di strumenti numerici di indagine per comprendere i processi di rimodellamento maladattativo e di formazione di tessuto fibroso.

RISULTATI RAGGIUNTI NEL 2021

- Progetto 4FRAILTY finanziato dal Ministero dell'università e della ricerca. L'attività numerica del progetto 4FRAILTY prevede la creazione di un modello computazionale per simulare la piattaforma sensoriale oggetto del progetto, utilizzando tutti i segnali vitali e ambientali raccolti dai device indossabili durante la fase di work-up dello studio.
- 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 2022

Gli obiettivi per il 2022 sono in linea con il ruolo ancillare che questa linea di ricerca svolge nell'ambito del programma di ingegneria di tessuto cardiovascolare della Fondazione RiMED e delle azioni congiunte con i suoi partner di ricerca clinica, in particolare:

- supporto alla progettazione per linee di ricerca TEHV, TECP e TEVG;
- supporto alla modellazione *in vitro* prevista in BE-ECM;
- sviluppo 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 crescita cellulare.

PUBBLICAZIONI

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. (2021). A Cell-free Biodegradable Synthetic Artificial Ligament for the Reconstruction of Anterior Cruciate Ligament (ACL) in a Rat Model. *Acta Biomaterialia*, 121, 275-287, 5Y-IF 716.

PRODOTTI: ATMP - Biomarcatori - Dispositivi biomedicali e Organi artificiali

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

Antonio D'Amore, PhD
adamore@fondazionerimed.com

COLLABORAZIONI

- University of Pittsburgh
- Università degli Studi di Palermo
- University of Nagoya, Japan

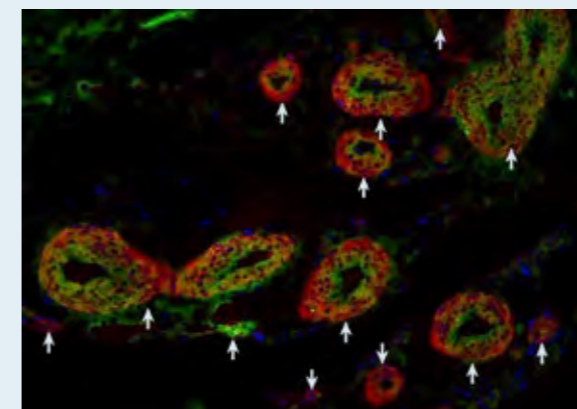
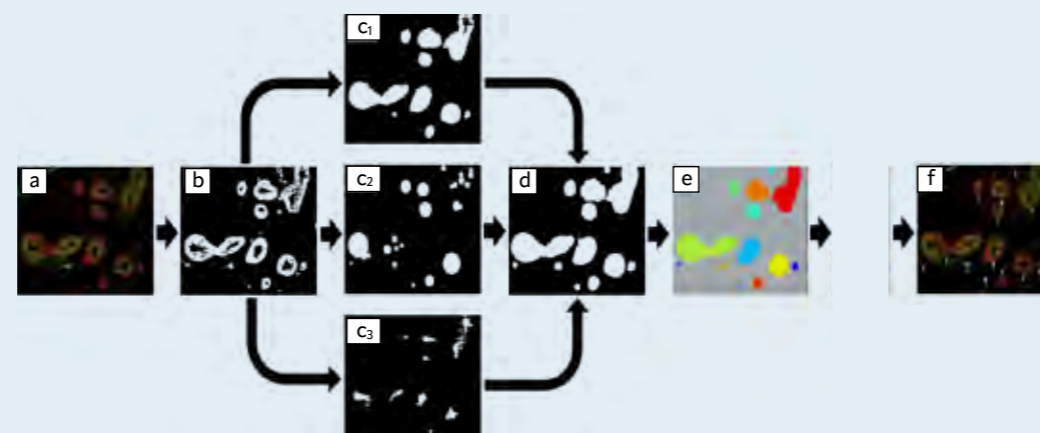
AREA TERAPEUTICA

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



BREVE DESCRIZIONE

Tema: NET-IBA, sviluppo di algoritmi e metodi automatici per l'analisi strutturale e morfologica di tessuti nativi e scaffolds. La seguente linea di ricerca si pone l'obiettivo di sviluppare algoritmi basati su tecniche di imaging per ottenere un maggiore controllo sui meccanismi che governano "struttura-funzione" dei tessuti. L'istopatologia ed i metodi di analisi quantitativa di struttura su base immagine sono al momento scarsamente sviluppati in modo integrato. Gran parte delle valutazioni in istologia avvengono ancora sulla base di stime qualitative o semi-qualitative. Analogamente, i metodi di analisi di immagine digitale sviluppati in contesti di scienza dei materiali non vengono ideati con un focus di potenziale rilevanza clinica. Questa linea di ricerca si posiziona all'interfaccia tra queste due discipline nel tentativo di fornire nuovi strumenti di indagine sia in ambito clinico che in ambito scienza dei materiali.



OBIETTIVI PER IL 2022

Estensione dei modelli di analisi strutturale nella versione 3D, per analizzare i tessuti nativi che ingegnerizzati. La corrente versione del software di analisi 2D prevede l'impiego di immagini estratte dal microscopio a scansione elettronica (SEM), la ricerca pianificata per il 2022 prevede l'estensione di questo software su modelli tridimensionali. Verrà condotta una attività sperimentale con il microscopio confocale che permetterà di ottenere informazioni volumetriche.

CONFERENZE

Ri.MED Research Retreat, Dicembre, 2021, Palermo. Poster Session: "Characterization of the complete fiber network topology of planar fibrous tissues and scaffolds".

Lezioni su invito

(1/2021) "Advancing Bioinspired polymer processing: how improved control over biomaterial structure-function can facilitate translation", school of engineering Polytechnic University of Turin, Italy, January 7th 2020.

PUBBLICAZIONI

S. K. Luketich, F. Cosentino, M. Di Giuseppe, G. Menallo, G. Nasello, M. Maneschi, F. Gulizzi, P. Livreri, W. R. Wagner, and A. D'Amore. Controlling in-plane mechanics of electrospun polyurethane scaffolds for cardiac tissue engineering applications. To be submitted to Journal of Mechanical Behavior of Biomedical Materials, IF: 3.23.

IMPATTO

Questa linea di ricerca ha un impatto potenziale su due temi 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* e *big-data*;
- **Metodi innovativi di analisi morfologica di materiali micro e nano-strutturati**, con applicazioni potenziali in contesto di ingegneria della produzione industriale, ingegneria chimica e dei materiali. Queste applicazioni includono: il controllo del processo, la caratterizzazione di processo e la caratterizzazione struttura-funzione.

RISULTATI RAGGIUNTI NEL 2021

- Validazione del software per le analisi dell'angiogenesi. Questo tool è in grado di quantificare il numero, l'area e la distribuzione spaziale dei vasi sanguigni nelle sezioni analizzate. Il metodo complessivo si compone di otto passaggi: media del filtraggio spaziale e thresholding; estrazione di componenti; operazioni morfologiche e controllo del vaso; rilevamento del cerchio e controllo dell'area del lume del vaso; rilevamento di fori; operazioni morfologiche; etichettatura dei componenti collegati; rilevamento del centroide dei vasi sanguigni. Il software è stato configurato come uno strumento open source che lavora su diversi sistemi operativi, supportato da un'interfaccia grafica intuitiva e facilita l'analisi su larga scala;
- Attività di supporto per NIH-R01 attualmente in svolgimento in collaborazione con l'Università di Pittsburgh;
- Software di supporto per le linee di ricerca sperimentali: BE-ECM, TECP, TEHV e TECP per analisi strutturali e morfologiche di tessuto nativo e ingegnerizzato.

PRODOTTI: Dispositivi biomedicali e Organi artificiali

Parete di miocardio ingegnerizzata (TECP)

Antonio D'Amore, PhD
adamore@fondazionerimed



COLLABORAZIONI

- University of Pittsburgh, Pittsburgh, Stati Uniti
- UPMC, Pittsburgh, Stati Uniti
- IRCCS ISMETT, Palermo, Italia
- UAI, Universidad Abierta Interamericana, Buenos Aires, Argentina
- JOMDD, Japanese Organization for Medical Device Development
- ATeN Center, Università di Palermo, Italia



AREA TERAPEUTICA

Insufficienze d'organo



BREVE DESCRIZIONE

TECP: sviluppo di dispositivi di supporto della funzione cardiaca per pazienti affetti da infarto del miocardio (MI).

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 di tali dispositivi è quello di fornire supporto meccanico al ventricolo mediante l'impianto chirurgico di TECP che vengono impiantate nell'epicardio infartuato.

Le TECP possono essere realizzate in modo da avvolgere l'intero ventricolo, oppure posizionate esclusivamente nell'area infartuata. I materiali impiegati nello sviluppo di TECP possono essere progettati secondo un profilo di degradazione adeguato a permettere

una degradazione graduale oppure il posizionamento permanente di una struttura non rigida. 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 TECP basati su matrici polimeriche in grado di riprodurre la meccanica nativa ed utilizzare scaffold compositi multi-strato costituiti da materiali bioattivi, come matrice extracellulare. Inoltre, la nostra vocazione è volta al trasferimento tecnologico focalizzato allo sviluppo e alla validazione di un sistema di *deployment* minimamente invasivo.

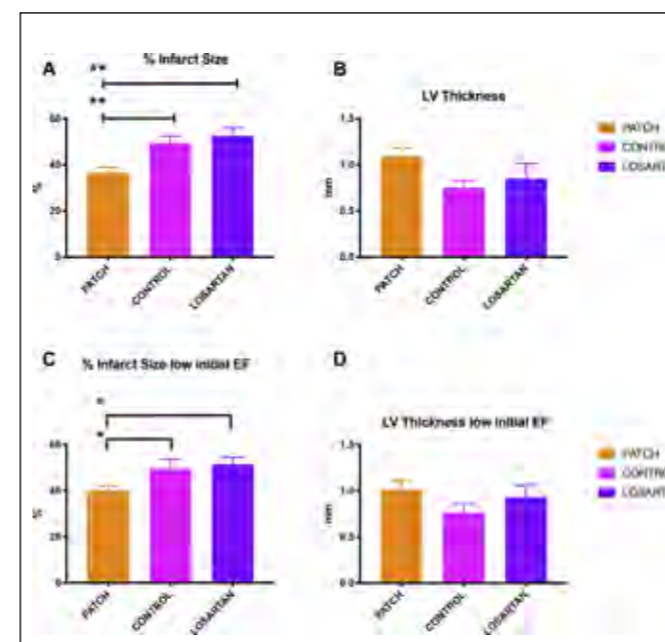
IMPATTO

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. Il World Health Organization (WHO) stima che la cardiomiopatia ischemica (ICM) sia una condizione ad elevato impatto epidemiologico in quanto costituisce una mortalità globale annua del 13.3%. Una delle conseguenze principali del MI è il rimodellamento maladattativo, mentre è stato valutato che il 2% dei pazienti che subiscono un MI del ventricolo sinistro, vanno incontro a rottura della parete del miocardio. 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. Inoltre, il patch cardiaco da noi proposto è ideato in modo da poter promuovere la crescita endogena di tessuto e, idealmente, indurre la rigenerazione o la protezione del tessuto cardiaco sano in prossimità della zona infartuata.



RISULTATI RAGGIUNTI NEL 2021

Bio-fabbricazione di un patch cardiaco bi-strato, costituito sia da matrice polimerica che matrice extracellulare ottenuta da cuore di maiale. Il patch ha dimostrato proprietà meccaniche compatibili con il comportamento del miocardio. Sono stati completati studi clinici *in vivo* su ratto che ha dimostrato un'alterazione della progressione del rimodellamento maladattativo, la mitigazione della formazione dell'area cicatriziale così come ha ridotto l'assottigliamento della parete del ventricolo sinistro, ed ha promosso l'angiogenesi. Inoltre, è stato osservato che il patch ha aumentato lo spessore del ventricolo sinistro e generato migliori funzionalità ecografiche e morfologiche dopo 8 settimane dall'impianto.



Premi conseguiti

- [G. 2] 4FRALTY National Operative Program (PON) from Italian Ministry for Education and Research, "Sensoristica intelligente, infrastrutture e modelli gestionali per la sicurezza di soggetti fragili", €250k for 3 years for 2021-2023. Principal-Investigator: A. D'Amore, Fondazione RiMED, Italy;
- [G.1] Industrial collaboration with JOMDD Medical Innovation and Adeka Corporation, "Characterization and comparative analysis of Adeka's pericardium patch" \$424k for 9 months (2021). Principal-Investigator: A. D'Amore (20% efforts), Dr Wagner Co-I. University of Pittsburgh.



OBIETTIVI PER IL 2022

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 2022 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 ISMETT;
- Studio preclinico su infarto cronico del miocardio su modello suino;
- Esplorare tecniche di impianto minimamente invasivo del patch cardiaco, progetto in collaborazione con il Dr Pilato, e Dr Raffa (ISMETT);
- Sviluppo di una piattaforma robotica per processing avanzato, protetta da proprietà intellettuale, in collaborazione con Advance Solutionç;
- 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

[J. A. 1] Lindenberg 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 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.

TECP: effect of cardiac patch on left ventricle thickness and infarct size. (A) Percent infarct size related to healthy tissue was lower in patch-treated animals than in control and losartan animals. (B) LV thickness was not significantly different among groups. (C, D) In animals with initial very low EF (<35%), percent infarct size was lower in patch-treated animals than in both nonpatched animals (C), whereas LV thickness did not show differences (D).

Valvole cardiache ingegnerizzate (TEHV)

Antonio D'Amore, PhD
adamore@fondazionerimed.com

COLLABORAZIONI

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

AREA TERAPEUTICA

Insufficienze d'organo



BREVE DESCRIZIONE

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

Obiettivi specifici:

- Caratterizzare e riprodurre struttura e meccanica delle valvole cardiache umane;
- Progettazione, prototipazione e validazione di protesi valvolari innovative in grado di:
 - Indurre crescita 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 compo-

nente (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.

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

IMPATTO

Circa 80.000 pazienti all'anno richiedono una sostituzione valvolare in US. La pratica clinica oggi prevede l'impiego di due classi di protesi: le valvole meccaniche e le bioprotesi. Le prime, per quanto longeve, richiedono l'uso di terapia anticoagulante cronica che a sua volta 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 2021

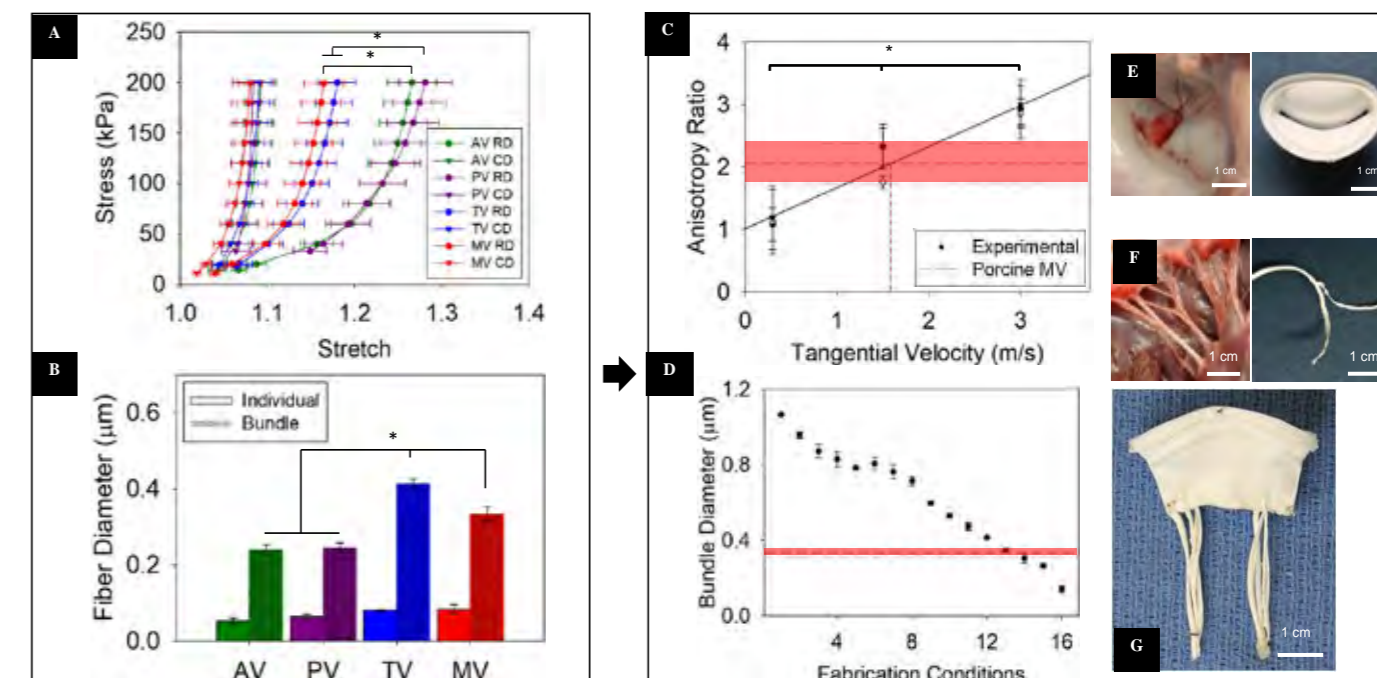
- Consolidata ulteriormente la start-up Neolife. Proseguita la valutazione del prototipo di valvola mitrale con apparato cordale incluso. Proseguiti test *in vivo* su *Large Animal Model* per la valutazione dei progressi su valvola mitrale e su valvola tricuspidale con e senza stent. Pubblicato studio della meccanica-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.

- Acquistata nuova piattaforma di biofabbricazione (BioAssembly-Bot®) in collaborazione con l'azienda Advanced Solutions Life Sciences (ASLS).

- Avviate collaborazioni con clinici e ricercatori su territorio nazionale per pubblicazioni e potenziali IP congiunti. Consolidata un'unità di ricerca, con 13 ricercatori, in Ingegneria Tissutale RiMED a Palermo (ITA) in collaborazione con ATeN Center e UniPA. Consolidate collaborazioni internazionali Italia/USA.

Fondi di ricerca ottenuti e/o gestiti

- [G.4] (2020-2025) European Research Council Consolidator Award # 101002561, Engineering the mitral valve: bioinspired control of structure and function for enhanced *in vivo* performance, (BIOMITRAL) €1,993,786 for 5 years. Sole Principal-Investigator: A. D'Amore, Host institution: Fondazione RiMED, Italy, partners: University of Pittsburgh and Istituto Mediterraneo per i Trapianti e le Terapie ad Alta Specializzazione (ISMETT-IRCCS).
- [G.3] (2021-2023) National Operative Program (PON) from Italian Ministry for Education and Research, Sensoristica intelligente, infrastrutture e modelli gestionali per la sicurezza di soggetti fragili, (4FRAILTY) €250,000 for 3 years. Principal-Investigator: A. D'Amore, Fondazione RiMED, Italy;
- [G.2] (2020-2023) Start-up package as Head of the Cardiac Tissue Engineering Program, total of €3,187,434 in direct cost: €1,985,634 for 2021, €596,400 for 2022, €596,400 for 2023, Sole Principal-Investigator: A. D'Amore, Fondazione RiMED, Italy;
- [G.1] (2019-2021) Pitt Innovation Challenge (PInCh) program. One-Valve: 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.





OBIETTIVI PER IL 2022

L'obiettivo di lungo termine è la traslazione della tecnologia (class III FDA), obiettivi specifici per il 2022 sono definiti come segue:

- Introduzione di nuovi sistemi di prototipazione rapida per la realizzazione in house di tools customizzati;
- Avvio del progetto BIOMITRAL finanziato dal Grant ERC Consolidator;
- Consolidamento 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 bio-processing per TEHV;
- Sviluppo di una nuova piattaforma per elettrodeposizione su superfici complesse;
- Completamento 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 Neolife e completamento dei progetti finanziati sulla linea TEHV;
- Formazione personale: quattro studenti di laurea master, cinque dottorandi
- Avvio di progetti congiunti McGowan Institute-UNIPA.

CONFERENZE

- [C. P. 3] D. Pedersen, F. Madonia, A. D'Amore, W. R. Wagner. Tissue to Organ Level Evaluation of Heart Valve Scaffold Performance under Dynamic Loading Conditions. Tissue Engineering and Regenerative Medicine International Society (TERMIS) 2021 World Congress. November 15-19, Maastricht, Nederland.
- [C. P. 2] A. Arianna, J. B. Bartolacci, M. Traina, W. R. Wagner, A. D'Amore. A continuous microfiber wire mandrel-less biofabrication for soft tissue engineering applications. Tissue Engineering and Regenerative Medicine International Society (TERMIS) 2021 World Congress. November 15-19, Maastricht, Nederland.
- [C.P.1] A. Adamo, J. Bartolacci, M. Traina, W. Wagner, A. D'Amore. Mandrel-less fabrication of biomimetic microfiber wires for soft tissue engineering applications Italian chapter of the European Society for Biomaterials annual meeting, SIB 2021, Lecce 11th - 14th July, Italy.

Interventi su invito

- [I. S. 6] (6/2021) "Engineering the mitral valve: bioinspired design to better address functional regurgitation", invited workshop, Innovabiomed "II network place per l'innovazione biomedica". Verona, Italy July 3rd 2021;
- [I. S. 5] (4/2021) "Bioinspired polymer processing: how improved control over biomaterial structure-function can facilitate translation", invited seminar for the Department of Physics and Chemistry Emilio Segrè, Univ. of Palermo, Italy, April 19th, 2021;
- [I. S. 7] (9/2021) "RiMED Cardiac Tissue Engineering Program: Overview On Technology Transfer And Translation" invited talk at ISMETT/UPMC Italy advanced therapies hospital facility located in Palermo Italy;

- [I. S. 4] (3/2021) "An overview on RiMED Tissue Engineering program", invited seminar for the Adolphe Merkle Institute, University of Fribourg, Switzerland, March 29th, 2021;
- [I. S. 3] (3/2021) "An overview on RiMED Tissue Engineering program", seminar series for the International PhD program on Biomedicine and Neuroscience, University of Palermo, Palermo, Italy March 27th, 2021

PUBBLICAZIONI

- [J. A. 4] Y. Matsumura, L. M. Silveira-Filho, G. Coyan, A. D'Amore, W. R. Wagner. Elastomeric tissue engineered template based tricuspid valve. To be submitted to J. of Thoracic and Cardiovascular Surgery, IF 4.88.
- [J. A. 3] 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.
- [J. A. 2] S. K. Luketich, G. Menallo, G. Nasello, M. Maneschi, F. Gulizzi, P. Livreri, W. R. Wagner, and A. D'Amore. Controlling in-plane mechanics of electrospun polyurethane scaffolds for cardiac tissue engineering applications. To be submitted to Journal of Mechanical Behavior of Biomedical Materials, IF: 3.23.
- [J. A. 1] A. Adamo, J. Bartolacci, M. Traina, A. Pantano, G. Gherzi, W. Wagner, S.F. Badyak, A. D'Amore. Bioprocessing, structure, mechanics and evaluation of micro-fiber based biodegradable suture material. Submitted to Biomaterials, 5Y-IF 8.97.

PROPRIETÀ INTELLETTUALE

- [I. D. 3] US patent application PCT/US21/054767 filed on 10/2021, topic: bioprocessing methods, title: "Hybrid micro molding-fiber deposition substrate processing for cell biology manipulation and local anisotropy". Lead innovator/developer: A D'Amore.
- [I. D. 2] 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.

Vasi sanguigni ingegnerizzati (TEVG)

Antonio D'Amore, PhD
adamore@fondazionerimed.com



COLLABORAZIONI

- University of Pittsburgh - Pittsburgh, USA;
- University of Medical Center Pittsburgh (UPMC) - Pittsburgh, USA;
- Advanced Technologies Network Center - ATeN Center, Palermo, Italia;
- LivaNova - Mirandola, Italia.



AREA TERAPEUTICA

Insufficienze d'organo



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 risteno del vaso fino ad un 50% dei casi trattati. Queste problematiche possono essere potenzialmente risolte mediante l'approccio dell'ingegneria di tessuto. Quest'ultimo

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

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 2021

Perfezionata tecnica di fabbricazione prototipo vaso artificiale a tre strati riprodotto 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 (IP "Hybrid micro molding-fiber deposition substrate processing for cell biology manipulation and local anisotropy", 2021). 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.

OBIETTIVI PER IL 2022

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:
 - oriprodurre la meccanica fisiologica di arterie e vene;
 - oindurre la crescita tissutale endogena riproducendo la funzionalità del vaso con una bassa trombogenicità;
 - oridurre l'iperplasia intimale;
- 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 endotelializzazione della tunica intima limitando la cascata della coagulazione e la formazione di trombi (che sono enormi limiti nell'applicazione clinica del TEVG);
- Studiare il profilo di degradazione del TEVG in condizioni fisiologiche;
- 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 endotelializzare 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).

Fondi di ricerca

[G.1] Start-up package as Head of the Cardiac Tissue Engineering Program, \$1.75 million for 3 years. Sole Principal-Investigator: A. D'Amore, Fondazione RiMED, Italia (2020-2023).

CONFERENZE

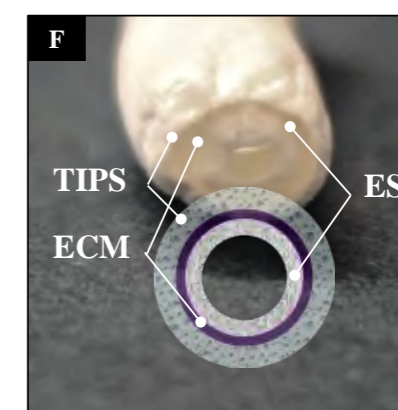
- [C.1.] "RiMED Cardiac Tissue Engineering Program: Overview On Technology Transfer And Translation" invited talk at ISMETT/UPMC Italy advanced therapies hospital facility located in Palermo Italy. September, 2021. Speaker: A. D'Amore.
- [C.2.] "Bioinspired polymer processing: how improved control over biomaterial structure-function can facilitate translation", invited seminar for the Department of Physics and Chemistry Emilio Segrè. April, 2021, University of Palermo, Palermo, Italy. Speaker: A. D'Amore.
- [C.1.] "An overview on RiMED Tissue Engineering program", invited seminar for the Adolphe Merkle Institute. March, 2021. University of Fribourg, Switzerland. Speaker: A. D'Amore.

Interventi su invito

- [I. S. 6] (6/2021) "Engineering the mitral valve: bioinspired design to better address functional regurgitation", invited workshop, Innovabiomed "Il network place per l'innovazione biomedica". Verona, Italy July 3rd 2021;
- [I. S. 5] (4/2021) "Bioinspired polymer processing: how improved control over biomaterial structure-function can facilitate translation", invited seminar for the Department of Physics and Chemistry Emilio Segrè, Univ. of Palermo, Italy, April 19th, 2021;
- [I. S. 7] (9/2021) "RiMED Cardiac Tissue Engineering Program: Overview On Technology Transfer And Translation" invited talk at ISMETT/UPMC Italy advanced therapies hospital facility located in Palermo Italy;
- [I. S. 4] (3/2021) "An overview on RiMED Tissue Engineering program", invited seminar for the Adolphe Merkle Institute, University of Fribourg, Switzerland, March 29th, 2021;

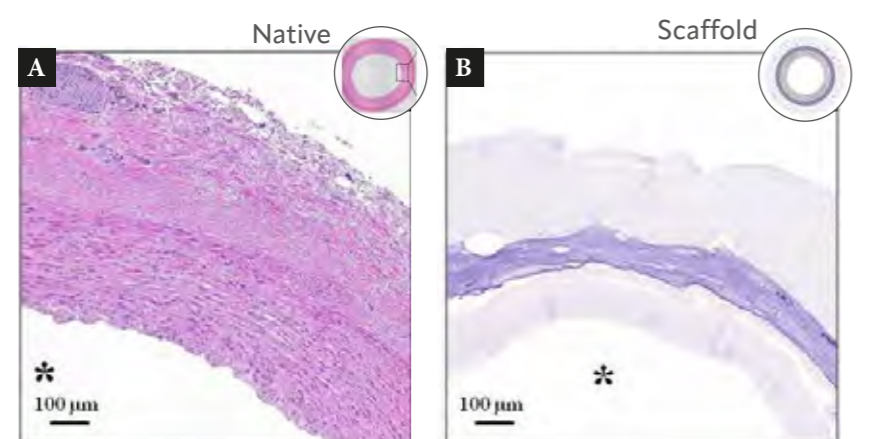
PROPRIETÀ INTELLETTUALE

- [I.D.2] US patent application PCT/US21/054767 filed on 10/2021, topic: bioprocessing methods, title: "Hybrid micro molding-fiber deposition substrate processing for cell biology manipulation and local anisotropy". Lead innovator/developer: A. D'Amore.
- [I.D.1] US patent PCT/US2018/043889, published date: 03/2021, topic: biomedical device, title: "Multi-layered graft for tissue engineering applications". Lead innovator/developer: A. D'Amore.

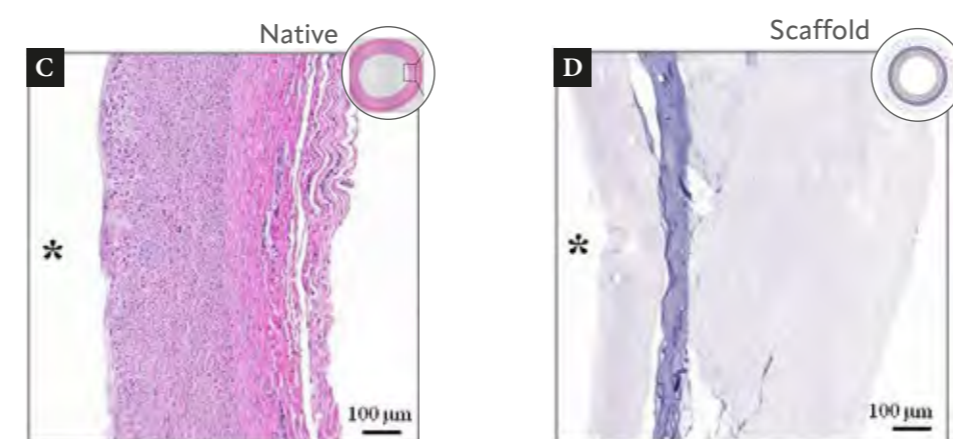


TEVG: Three-layer vascular graft mimicking coronary arteries' structure and mechanics. (A-D) Native and engineered vessel cross-section and longitudinal section comparison showing a three-layer arrangement mimicking the tunica intima, media, and adventitia. Asterisk indicates the vessel's lumen. (E) Quantitative comparison between the artificial and native vessel tunica thickness, quantification based on H&E staining in A-D. (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). Related publications: Krawiec, H. Liao, A. Josowitz, J. Weinbaum, A. D'Amore, P. Rubin, W. R. Wagner, D. Vorp. In Vivo Functional Evaluation of Tissue Engineered Vascular Grafts Fabricated Using Human Adipose-Derived Stem Cells from High-Cardiovascular Risk Populations. *Tissue Engineering Part A*, 2016 22 (9-10), 765-775, IF 3.89. Related intellectual property: PCT/US2018/043889, "Multi-Layered Graft for Tissue Engineering Applications".

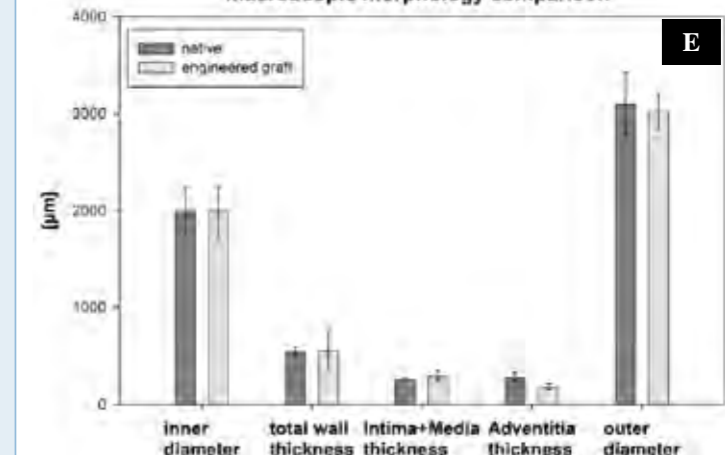
Cross section

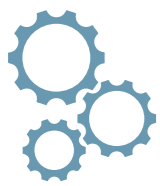


Longitudinal section



macroscopic morphology comparison



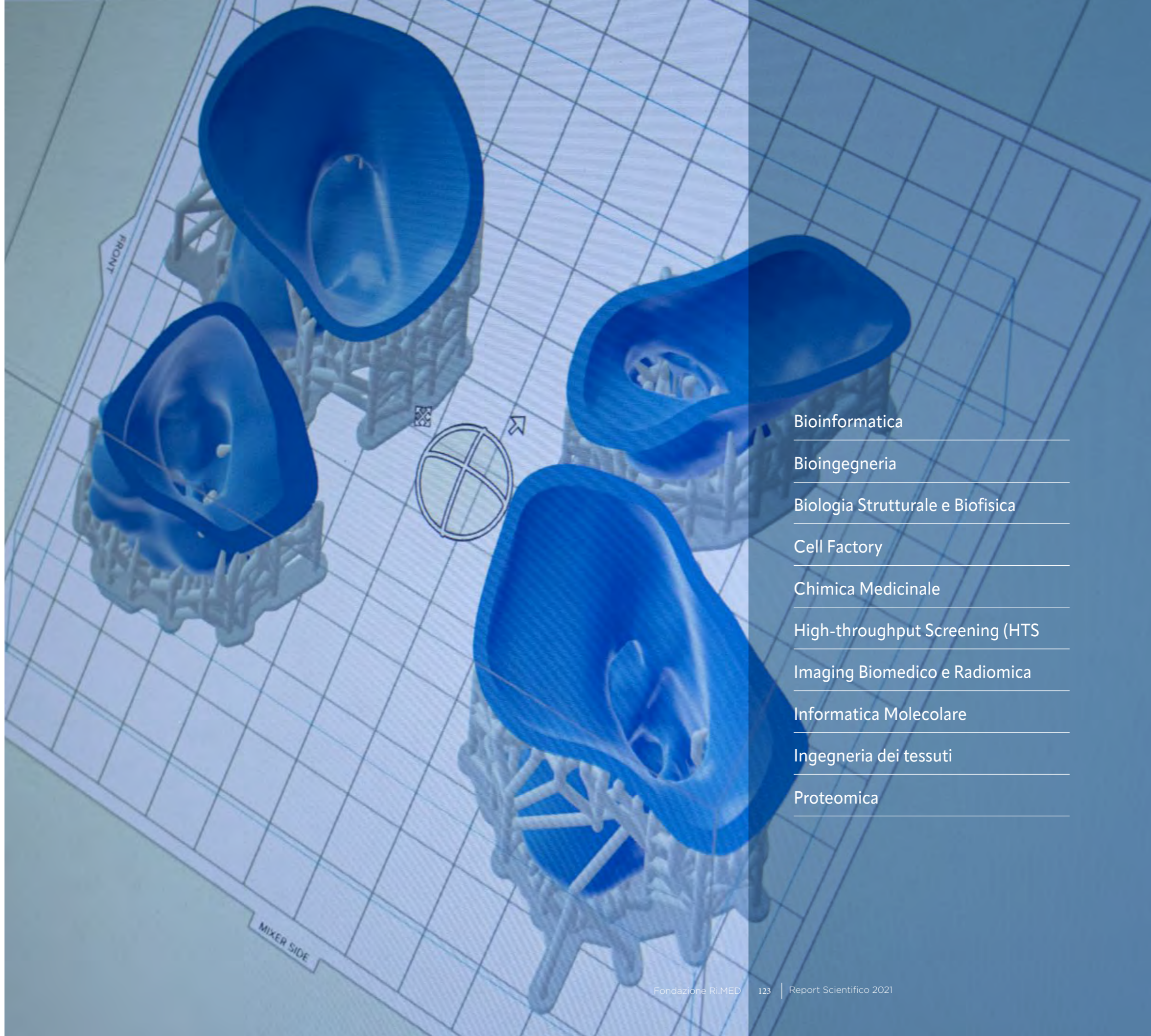


PIATTAFORME TECNOLOGICHE

Negli ultimi anni, soprattutto grazie ai finanziamenti erogati dalla Regione Siciliana e dal Dipartimento CASA ITALIA della Presidenza del Consiglio dei Ministri, 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 del laboratorio di **Bioingegneria**.

La piattaforma di **Biologia strutturale e Biofisica** 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 ISMETT è in funzione una **Cell factory** per la produzione di ATMP, mentre il gruppo di **Proteomica** supporta l'identificazione di nuovi target farmacologici e di biomarcatori.

L'importante novità del 2021 è stata l'allestimento della **Piattaforma di Ingegneria dei Tessuti**, resa possibile anche grazie ai finanziamenti ottenuti con la vittoria dell'ERC da parte di Antonio D'Amore. Questa piattaforma consente la caratterizzazione meccanica e strutturale dei tessuti nativi e bioingegnerizzati e lo studio *in vitro* ed *in vivo* dello sviluppo di tessuto *de novo*. Dispone inoltre dei software per l'elaborazione di modelli numerici predittivi la rigenerazione dei tessuti e la strumentazione per lo sviluppo di valvole cardiache ingegnerizzate tramite l'uso di un braccio robotico a sei gradi di libertà. Nel corso del 2021 è stato inoltre completato l'allestimento della 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

Ingegneria dei tessuti

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.

PARTNERSHIPS E 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
4600	2543*	55388	16822	16144	15778	13325	16019	14040	14575	12929	14535	8999	9274	13177	11827	12319	14190	13439	3152	46985	13412
6110	2610	11650	12067	15445	16578	15821	15474	14351	16736	13660	15558	11410	13904	13770	14483	33580	14031	5147	14224	9486	12968
6337	2637	17541	18921	16783	34824	14840	16313	4401	53066	15096	13781	10602	12045	13504	11245	14855	13944	15420	17901	13059	13197
8379	2872	13032	15366	15709	15718	16038	15832	15857	12401	13480	14636	10890	12587	11642	12745	13830	13737	11803	25044	15418	13046
19608	2663	15130	16256	16359	16030	12294	13785	14924	22570	16096	2278	9115	11611	9637	12910	10959	16376	14726	11796	14406	14745
11281	2816	10515	16878	7465	15978	15302	13631	16601	15161	21726	13162	9803	11643	11958	14150	13883	14472	11771	8008	10989	14488
9889	2538	13787	16407	13812	13663	21985	36873	14072	2366	8472	15110	12500	2677	12367	14901	14155	14368	13140	50266	11824	13506
7464	2649	23082	15655	9604	16668	16037	14261	15610	13233	11025	35194	10845	11834	27705	13794	12923	3818	11516	13825	12538	12655
6741	2735	10245	9503	16398	37993	18784	14577	12919	15471	3054	3744	10837	3529	12978	11201	12231	12059	14499	13980	12608	13575
8687	2727	19429	15864	14548	16823	15891	5625	19131	14667	16213	13482	11276	12455	14174	15970	13134	13684	13112	13138	12919	12716
19412	2826	16243	17558	9518	16357	22227	12605	14097	15924	18246	17745	12608	27950	14372	13600	16445	12974	13717	15052	14988	5999
10380	2822	15333	17777	6138	16000	15517	17038	15956	7366	15277	17363	7438	14546	13936	51778	11726	13548	14067	30200	13207	14674
11711	2821	15744	14008	16134	13331	15268	19778	15458	14712	17402	14902	10954	13015	13524	13718	13538	10909	14066	15395	15913	13567



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;

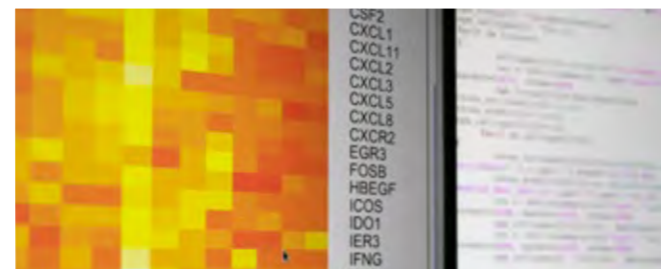
Dotazione tecnologica

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

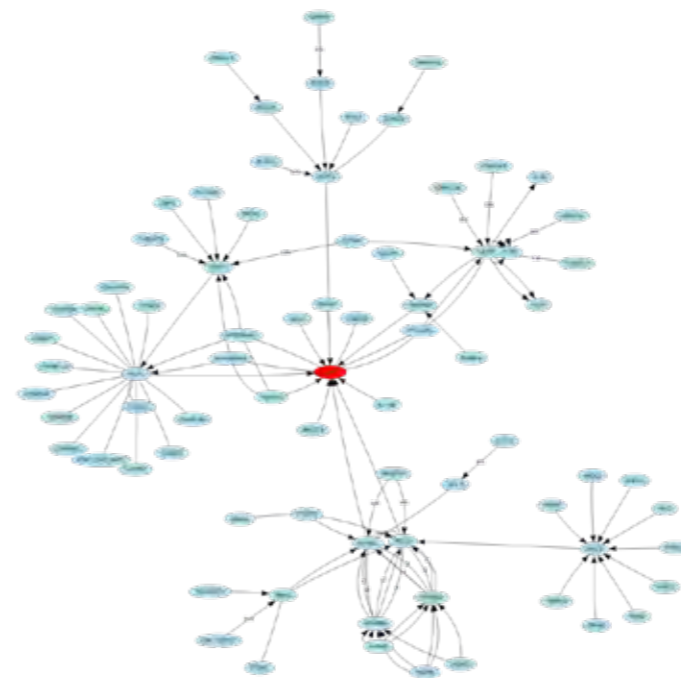
- 3 workstation
- Server - CPU: 2x Xeon Gold 6152 2.10 GHz 22 Cores RAM: 128GB
- Server - CPU: 2x AMD Epyc 7402 24 Cores 2.8GHz RAM: 256GB HDD: 3x 480GB SSD GPU: 2x Nvidia A100 40GB



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 messenger, 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.



Esempio di network di interazioni biologiche

PUBBLICAZIONI

Coronello, C, Francipane MG (2021) Moving Towards Induced Pluripotent Stem Cell-based Therapies with Artificial Intelligence and Machine Learning, Stem cell reviews and reports 1-11. doi.org/10.1007/s12015-021-10302-y

Coronello C, Busà R, Cicero L, Comelli A, Badami E (2021) A Radioactive-Free Method for the Thorough Analysis of the Kinetics of Cell Cytotoxicity, Journal of Imaging 7 (11), 222. doi.org/10.3390/jimaging7110222

Cilluffo D, Chiavetta RF, Bivona S, Contino F, **Coronello C**, Feo S, Di Leonardo A, Barra V (2021) Transcriptomic Changes Following Partial Depletion of CENP-E in Normal Human Fibroblasts. Genes 12 (9), 1322. doi.org/10.3390/genes12091322

Iannolo G, Sciuto MR, Cuscino N, **Carcione C, Coronello C, Chinnici CM**, Raffa GM, Pilato M, Conaldi PG, miRNA expression analysis in the human heart: Undifferentiated progenitors vs. biopic tissues—Implications for proliferation and ageing, Journal of Cellular and Molecular Medicine. 25 (18), 8687-8700, doi.org/10.1111/jcmm.16824



Piattaforma di Bioingegneria

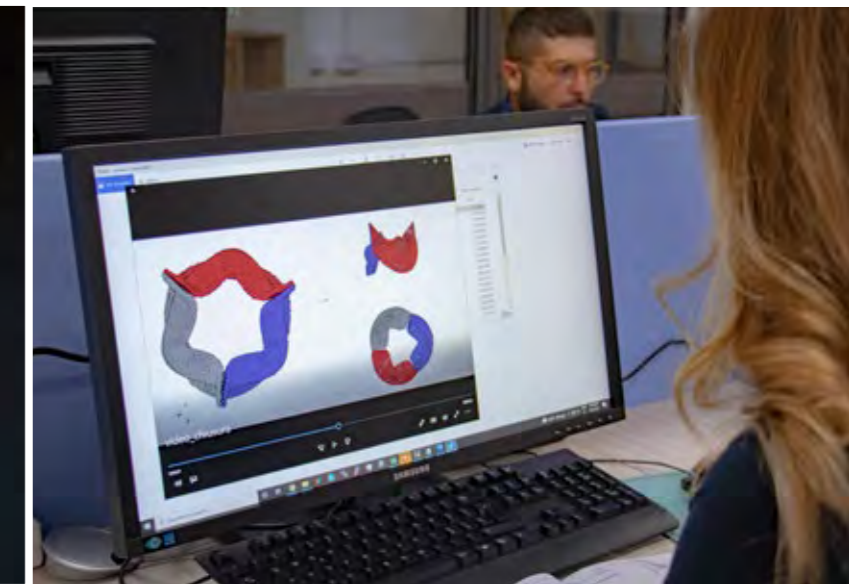


CONTATTI:
Gaetano Burriesci, PhD
gburriesci@fondazionerimed.com

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.

PARTNERSHIPS E COLLABORAZIONI

- ISMETT- IRCCS, Palermo, IT
- Policlinico Giaccone, Palermo, IT
- Università degli Studi di Palermo, IT
- Institute Foundation G. Giglio, IT
- Università degli studi di Padova, IT
- Université de Technologie de Compiègne, FR
- Barts Heart Centre at St Bartholomew's Hospital, GB
- Great Ormond Street Hospital for Children, GB
- University College London, GB
- Queen Mary University of London, GB
- University of Bristol, GB
- University of Leeds, GB
- University of Pittsburgh, US
- University of Alabama at Birmingham, US
- Adeka, JP



Competenze

- Sviluppo di dispositivi impiantabili cardiovascolari;
- 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



PUBBLICAZIONI

Di Leonardo, S., Cappello, R., Burriesci, G., Pitarresi, G. (2021) Investigation of the thermomechanical response of cyclically loaded NiTi alloys by means of temperature frequency domain analyses. *Materials*, 14: 7866. <https://doi.org/10.3390/ma14247866>

McGregor, C., Salmonsmit, J., Burriesci, G., Byrne, G.W. (2021) Biological Equivalence of GGTA-1 Glycosyltransferase Knockout and Standard Porcine Pericardial Tissue using 90-day Mitral Valve Implantation in Adolescent Sheep. *Cardiovascular Engineering and Technology*. <https://doi.org/10.1007/s13239-021-00585-0>

McGregor, C., Salmonsmit, J., Burriesci, G., Byrne, G.W. (2021) Biological equivalence of GGTA-1 glycosyltransferase knockout and standard porcine pericardial tissue using 90-day mitral valve implantation in adolescent sheep. *Xenotransplantation* 28(5): Abstract 310.4

Annio, G., Torii, R., Ducci, A., Muthurangu, V., Tsang, V., Burriesci, G. (2021) Experimental validation of Enhanced Magnetic Resonance Imaging (EMRI) using Particle Image Velocimetry (PIV). *Annals of Biomedical Engineering* 49: 3481–3493. <https://doi.org/10.1007/s10439-021-02811-1>

Tango, A.M., Ducci, A., Burriesci, G. (2021) *In silico* study of the ageing effect upon aortic valves. *Journal of Fluids and Structures*, 103:103258. <https://doi.org/10.1016/j.jfluidstructs.2021.103258>.

Vella, D., Monteleone, A., Musotto, G., Bosi, G.M., Burriesci, G. (2021) Effect of the Alterations in Contractility and Morphology Produced by Atrial Fibrillation on the Thrombosis Potential of the Left Atrial Appendage. *Front. Bioeng. Biotechnol.* 9: 586041. doi: 10.3389/fbioe.2021.586041

Burriesci, G., Rahmani, B., Byrne, G., McGregor, C. (2021) Bioprosthetic heart valve. Patent US11109962 B2 (granted)

Burriesci, G. (2021) 半刚性瓣环成形环及其制造方法. Patent Application CN112437650

Burriesci, G. (2021) Semi-rigid annuloplasty ring and method of manufacturing. Patent Application EP3793479 A1

PROGETTI DI RICERCA ATTIVI

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.



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 dicroismo circolare, la calorimetria e l'interferometria. Nel 2022 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.

PARTNERSHIPS E COLLABORAZIONI

- King's College London, Londra, Regno Unito
- Scuola Normale Superiore of Pisa, Italia
- Fondazione EBRI Rita Levi Montalcini
- 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
- European Synchrotron Radiation Facility (ESRF)
- 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

- Sviluppo di anticorpi neutralizzanti contro SARS-CoV-2.
- Identificazione e caratterizzazione delle interazioni tra SARS-CoV-2 e proteine LaRP.
- Meccanismi molecolari delle malattie da misfolding proteico.
- Studi strutturali e biofisici per sondare l'interazione di KDM4a con potenziali inibitori.
- Sviluppo di bioadesivi non tossici per ambienti acquosi.
- Ruolo dell'interazione alpha-sinucleina/membrane nel morbo di Parkinson
- BLI- e NMR-based fragment screening.
- Studi sulla relazione struttura/funzione in proteine di SARS-CoV-2.

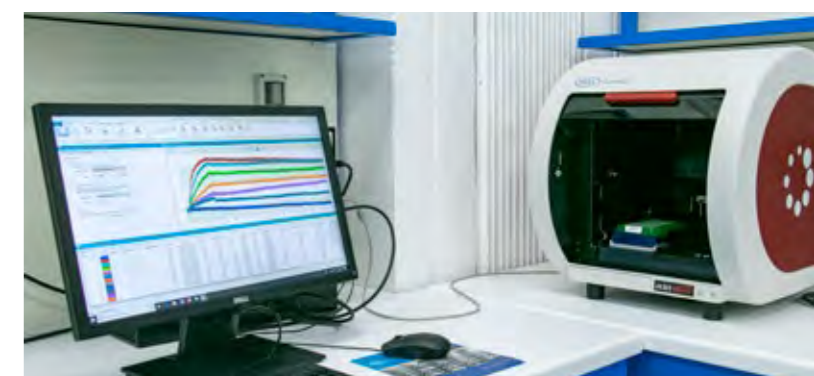
PUBBLICAZIONI

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*, 8:89. doi: 10.3389/fmolb.2021.653148.

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*, 5(2):235-241. doi: 10.1007/s12104-021-10011-0.

Morando M.A., **Venturella F.**, **Monaca E.**, **Sabbatella R.**, Rosa Passantino, Pastore A., **Alfano C.** (2021) The solution structure of recombinant Pvfp-5β reveals new insights into mussel adhesion. *Comm Biol*. Submitted

Passantino R., Mangione M.R., Ortore M.G., Costa M.A., Provenzano A., Amenitsch H., **Alfano C.**, Martorana V., Vilasi S. (2021) Investigation on a MMACHC mutant from cblC disease. *BBA - Proteins and Proteomics* - Submitted



Piattaforma Cell Factory

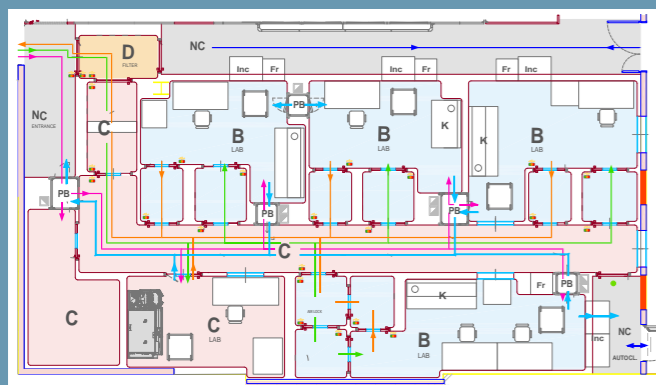


CONTATTI:
Chiara Di Bartolo, MSC
cdibartolo@fondazionerimed.com

Il Gruppo Cell Factory, che consiste di staff di Produzione, Assicurazione Qualità e Controllo Qualità della Fondazione Ri.MED, nonchè di una Persona Qualificata ISMETT per il rilascio di prodotti di Terapie Avanzate per uso clinico, mette a disposizione 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 permetterà di produrre terapie avanzate sviluppate dai ricercatori Fondazione Ri.MED e 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.



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

PARTNERSHIPS E 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, collaudata nel dicembre 2021, garantisce flessibilità per varie tipologie di produzione e funzionalità degli ambienti. Sulla base di specifiche User Requirement Specification sono stati sviluppati (e approvati da AIFA durante un incontro di Scientific Advice) layout di aree di produzione e controllo qualità per le differenti tipologie di terapie avanzate: terapia genica, terapia cellulare somatica, ingegneria dei tessuti e medicinali per terapie avanzate combinate. Sono stati realizzati 4 laboratori di classe B, di cui uno a maggior contenimento, 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 essere resi comunicanti a due a due, di modo che un prodotto intermedio preparato in un laboratorio possa essere passato attraverso un passbox nel laboratorio adiacente per subire ulteriore manipolazione. Inoltre, è stata realizzata una stanza in classe C, in cui sono stati posizionati 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 per condurre tutti i test su materie prime,

intermedi e prodotti finali necessari per il rilascio del prodotto, nonchè per la ricezione e conservazione di reagenti, materiali e prodotti. Sia l'area produttiva, sia il laboratorio Controllo Qualità sono dotati di sistema di monitoraggio per il controllo in remoto dei parametri critici.



ATTIVITÀ

La nuova cell factory è al momento equipaggiata con la quasi totalità degli strumenti, e si sta provvedendo al completamento degli arredi. Nel 2022 si completeranno le qualifiche di tutta la strumentazione standard e specialistica.

Il personale cell factory eseguirà nel corso del 2022 le convalide di processi generali (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 (terapie immunoadottive), verranno effettuate convalide specifiche del processo produttivo e dei 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.

Proseguiranno le attività di mantenimento ed aggiornamento del sistema di assicurazione qualità ed il training continuo del personale.



Piattaforma di Chimica Medicinale



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

Il gruppo di Chimica Medicinale ha come focus la progettazione e la sintesi di nuovi composti, la creazione di librerie di molecole e collezioni di building blocks, e mira alla scoperta di nuovi principi attivi verso il target terapeutico di interesse. La piattaforma di Chimica Medicinale supporta le prime fasi dei programmi di scoperta di farmaci, e in particolare si occupa di confermare le strutture degli attivi preliminari e di sintetizzarli ove necessario; di ampliare le serie chimiche; e infine, lavora sull'ottimizzazione strutturale dei composti promettenti nella fase hit-to-lead. Le competenze comprendono la progettazione, la sintesi organica e la caratterizzazione analitica dei composti di nuova sintesi. Inoltre, gli studi delle relazioni struttura-attività (SAR) consentono di esplorare lo spazio chimico dei composti biologicamente interessanti e di definire meglio il loro profilo farmacocinetico in termini di potenza ed efficacia. I laboratori sono completamente attrezzati e possono gestire tutte le fasi del flusso di lavoro, quali i) il set-up delle reazioni; ii) la lavorazione e la purificazione delle miscele di reazione; iii) l'isolamento dei composti di interesse; iv) la caratterizzazione analitica delle strutture; v) la valutazione del grado di purezza.

PARTNERSHIPS E COLLABORAZIONI

- Università degli studi della Campania "Luigi Vanvitelli", Napoli, Italia
- Istituto per la Ricerca e l'Innovazione Biomedica (IRIB) - CNR, Palermo, Italia



Competenze

- Progettazione di molecole
- Sintesi organica (anche assistita dalle microonde)
- Pianificazione, sviluppo e ottimizzazione delle vie sintetiche
- Chimica di small molecules, peptidi e peptidomimetici
- Purificazione di miscele di reazione complesse, in fase normale e inversa
- Elucidazione strutturale
- Caratterizzazione analitica
- Valutazione del grado di purezza e controllo qualità

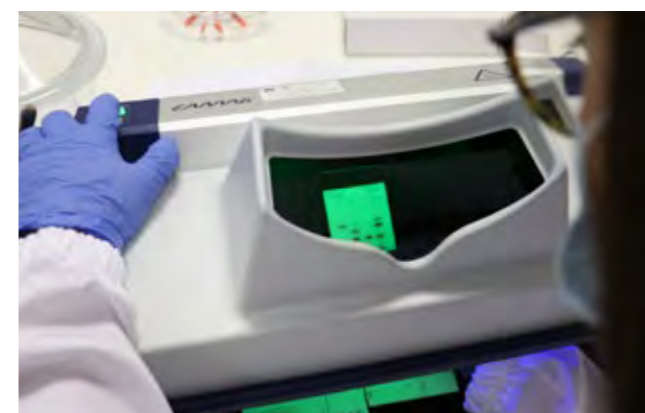
Dotazione tecnologica

- 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

- Reattore di microonde (MW): Trasformazioni catalitiche in fase omogenea ed eterogenea
- Evaporatore centrifugo sottovuoto adatto anche alla liofilizzazione

Implementazione della dotazione tecnologica:

- Sistema di purificazione dei solventi: Rapida e sicura produzione di solventi anidri, necessari per reazioni che richiedono l'ambiente inerte
- Sintetizzatore automatico di peptidi per sintesi parallela



PROGETTI DI RICERCA ATTIVI

- Progettazione e sintesi di nuovi potenziali inibitori dell'Inflammasoma NLRP3, target validato per l'infiammazione cronica caratteristica delle malattie dell'invecchiamento
- Progettazione e sintesi di nuovi potenziali inibitori selettivi di KDM4a, come farmaci anti-tumorali

PUBBLICAZIONI

- Mekni, N.; Coronello, C.; Langer, T.; De Rosa, M.; Perricone, U. (2021). Support Vector Machine as a Supervised Learning for the Prioritization of Novel Potential SARS-CoV-2 Main Protease Inhibitors. *Int. J. Mol. Sci.*, 22, 7714 (1-20). doi.org/10.3390
- Sharma, A.; De Rosa, M.; Singla, N.; Singh, G.; Barnwal, R. P.; Pandey, A. (2021). Tuberculosis: An Overview of the Immunogenic Response, Disease Progression, and Medicinal Chemistry Efforts in the Last Decade toward the Development of Potential Drugs for Extensively Drug-Resistant Tuberculosis Strains. *J. Med. Chem.* 64(8), 4359-4395. doi.org/10.1021/acs.jmedchem.0c01833

Piattaforma di High-throughput Screening



CONTATTI:
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 la messa a punto 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

PARTNERSHIPS E COLLABORAZIONI

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

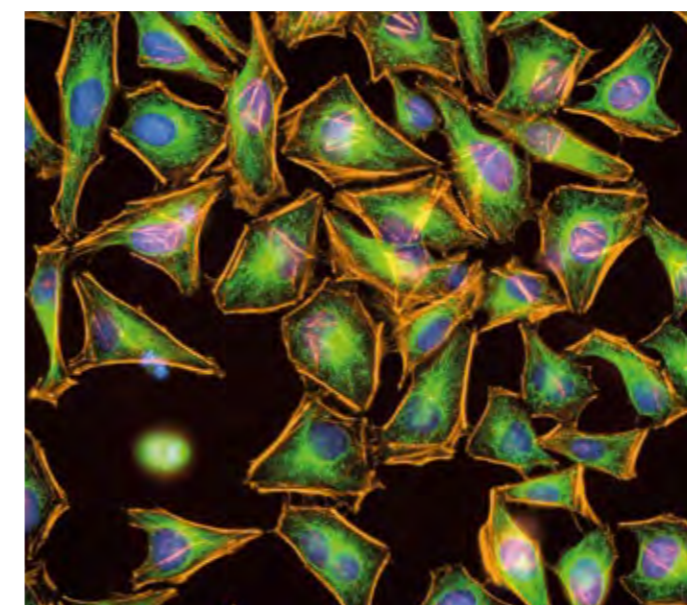
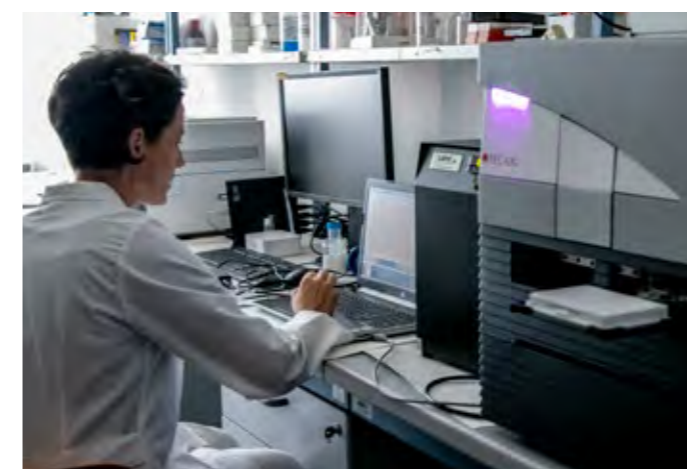
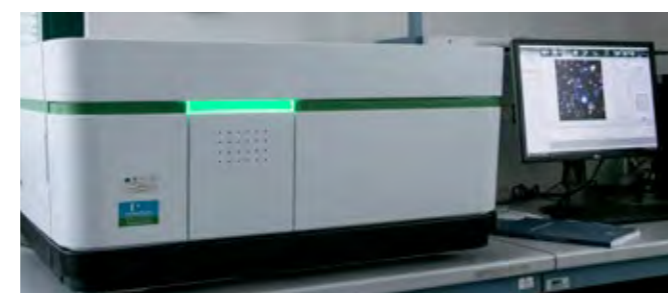


Competenze

- 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

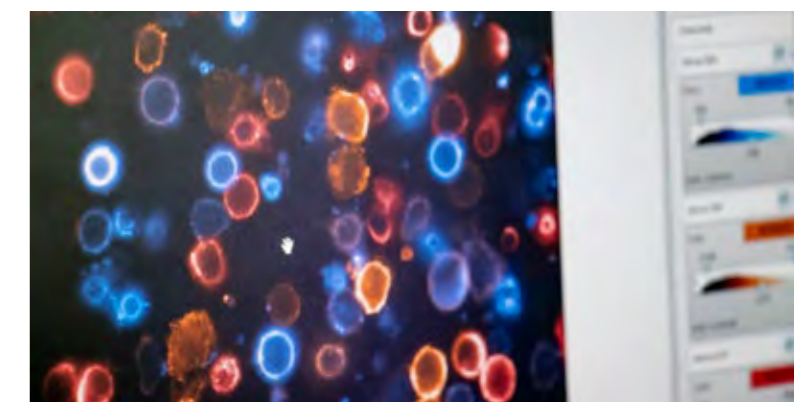
- Wet lab per biologia cellulare e molecolare;
- EL406 (Biotek) – automatic microplate washer/dispenser;
- Aquamax 4000 – automatic microplate washer for gentle cell washing;
- Operetta-CLS (Perkin Elmer) – high-content imaging system;
- Spark (Tecan) - multimode microplate reader;
- In-Hood-Bravo (Agilent) - 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. A questo scopo, è stato messo a punto un saggio enzimatico primario per lo screening di librerie di molecole opportunamente selezionate. La prima campagna di screening è stata completata a Gennaio 2021 e ha portato all'identificazioni di un hit validato che adesso è in fase di studio;

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. Nel 2021 è stata completata la validazione del saggio primario, 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. E' stata inoltre completata la prima campagna di screening i cui risultati sono in corso di validazione.



Piattaforma di Imaging Biomedico e Radiomica

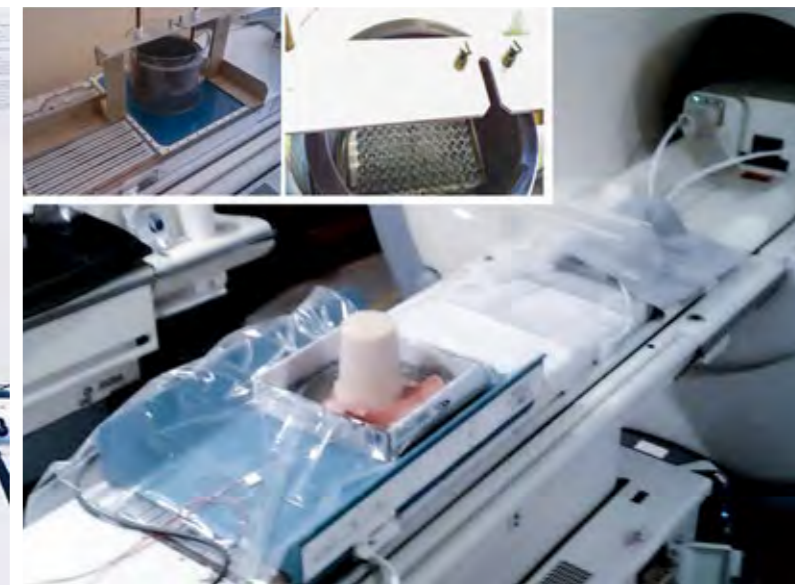


CONTATTI:
Albert Comelli, PhD
acomelli@fondazionerimed.com

Durante il 2021, la piattaforma di Elaborazione di Immagini Biomediche, Radiomica e Analisi 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 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, attualmente 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 2022, la piattaforma sarà arricchita con un gamma counter WIZARD 2470 con 10 detector PerkinElmer e i dispositivi di radioprotezione (presso ISMETT), una microCT Skyscan 1276 CMOS Bruker e una Magnetic Resonance guided Focused UltraSound Surgery (MRgFUS) - ExAblate 2100 - InSightec (presso IZS) al fine di offrire più opzioni per l'imaging e la radiomica.

PARTNERSHIPS E COLLABORAZIONI

- 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
- Dipartimento di Promozione della Salute, Assistenza Madre e Infanzia, Medicina Interna e Specialità Mediche, (PROMISE), Università di Palermo, Italia
- Dipartimento di Biomedicina, Neuroscienze e Diagnostica avanzata (BIND), University of Palermo, Palermo, Italia
- Dipartimento di Ingegneria, Università di Palermo, Italia
- Dipartimento di Scienze Agrarie, Alimentari e Forestali
- Università degli Studi di Palermo Unità di Fisica Medica, Ospedale Cannizzaro, Catania, Italia
- Dipartimento 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*
- Studi di radiobiologia *in vitro* e *in vivo* su radiofarmaci innovativi
- Chirurgia a ultrasuoni focalizzati guidati da risonanza magnetica *in vitro* e *in vivo* (MRgFUS)

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, Jmrui, Tarquin, Horos

Presso IRCCS ISMETT:

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

Presso (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.

Studi *in vitro* di radiobiologia su radiofarmaci innovativi attraverso saggi farmacocinetici, di trafficking e vitalità cellulare (progetto ISOLPHARM). IBFM-CNR: Dr. Giorgio Russo e Dr. Alessandro Stefano. Fondazione Ri.MED: Dr. Albert Comelli, Dr.ssa Claudia Coronello, Dr.ssa Monica Miele, Dr. Walter Arancio e Dr.ssa Viviana Benfante.

Classificazione diagnostica del grado di ipertensione portale nei pazienti con cirrosi utilizzando caratteristiche radiomiche e algoritmi intelligenti sulla CT. ISMETT: Dott. Roberto Miraglia e Dott. Giuseppe Mammone. Fondazione Ri.MED: Dr. Albert Comelli e Dr.ssa Claudia Coronello.

Studi di biodistribuzione *in vivo* per la valutazione dell'efficacia del trattamento di "radiofarmaci direzionati" su modello preclinico murino in diagnosi e teranostica (progetto ISOLPHARM). IBFM-CNR: Dr. Giorgio Russo, Dr. Francesco Cammarata e Dr. Alessandro Stefano. Fondazione Ri.MED: Dr. Albert Comelli e Dr.ssa Viviana Benfante.

Studi *in vitro* e *in vivo* di imaging funzionale mediante Magnetic Resonance Guided Focused Ultrasound Surgery (MRgFUS) su cellule tumorali e modello preclinico murino per trattamenti di medicina personalizzata con e senza scaffold. IBFM-CNR: Dr. Giorgio Russo e Dr. Alessandro Stefano. Fondazione Ri.MED: Dr. Albert Comelli, Dr.ssa Claudia Coronello, Dr. Walter Arancio, Dr. Simone Valenti e Dr.ssa Viviana Benfante.

PUBBLICAZIONI

C. Coronello, R. Busà, L. Cicero, A. Comelli, E. Badami. A Radioactive-Free Method for the Thorough Analysis of the Kinetics of Cell Cytotoxicity. *Journal of Imaging*. 2021; 7(11):222. DOI 10.3390/jimaging7110222.

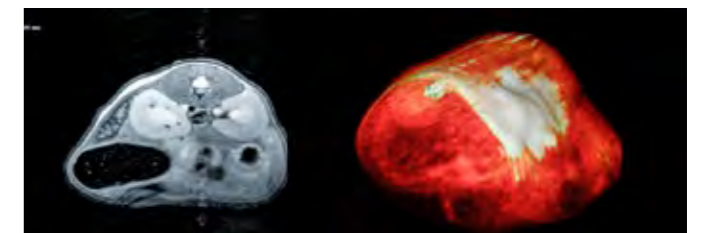
A. Stefano, P. Pisciotta, M. Pometti, A. Comelli, S. Cosentino, F. Marletta, S. Cicero, M.G. Sabini, M. Ippolito, G. Russo. Early Monitoring Response to The-

rapy in Patients with Brain Lesions Using the Cumulative SUV Histogram. *Applied Sciences*. 2021; 11(7):2999. DOI 10.3390/app11072999.

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

G. Salvaggio, A. Comelli, M. Portoghese, G. Cutaita, R. Cannella, F. Vernuccio, A. Stefano, N. Dispensa, G. La Tona, L. Salvaggio, M. Calamia, C. Gagliardo, R. Lagalla and M. Midiri. Deep learning network for segmentation of the prostate gland with median lobe enlargement in T2-weighted MR images: comparison with manual segmentation method. *Current Problems in Diagnostic Radiology*. DOI 10.1067/j.cpradiol.2021.06.006.

A. Comelli, N. Dahiya, A. Stefano, V. Benfante, G. Gentile, V. Agnese, G.M. Raffa, M. Pilato, A. Yezzi, G. Petrucci and S. Pasta. Deep learning approach for the segmentation of aneurysmal ascending aorta. *Biomed. Eng. Lett.* (2021). DOI 10.1007/s13534-020-00179-0.



Piattaforma di Informatica Molecolare



CONTATTI:
Ugo Perricone, PhD
uperricone@fondazionerimed.com

Il gruppo di Molecular Informatics 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-Troughput (HTS). Negli ultimi anni, la collaborazione con il gruppo di ingegneria informatica dell'Università degli Studi 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. Durante l'ultimo anno inoltre, il gruppo si è formato e ha potuto avviare la piattaforma di *in silico* Biologics che servirà per il design e la progettazione di farmaci biologici.

PARTNERSHIPS E COLLABORAZIONI

- Institut de La Vision, Parigi, Francia
- Università di Vienna (Dip. di Chimica Farmaceutica), Austria
- University of Pittsburgh, Stati Uniti
- Università degli Studi della Campania "Luigi Vanvitelli", Napoli, 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

- Schrödinger suite for small molecule drug discovery
- Schrödinger suite for biologics drug discovery
- LigandScout expert suite
- Autodock and Autodock Vina
- QSARINS
- DESMOND (OPLS2005 and OPLS3e, OPLS4)
- AMBER
- NAMD
- VMD
- GROMACS
- KNIME

Hardware

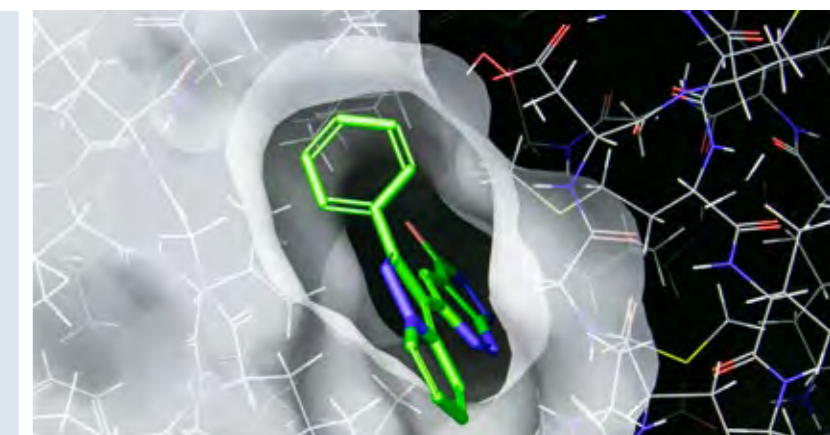
- 6 Workstations
- Server: 80 cores e 2 x NVIDIA Tesla K80
- Server: 96 cores e 2 x NVIDIA A100

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 di NLRP3 quale target della patologia infiammatoria
- Ricerca di modulatori di proteine coinvolte nella regolazione epigenetica della patologia tumorale (KDM4)
- Progettazione e sviluppo di inibitori della CDK1 coinvolta nelle patologie tumorali.
- Progettazione modulatori dell'interazione proteina-proteina con particolare riferimento ai complessi MUC1-CIN85
- Progettazione di inibitori della Main protease (Mpro) SARS-CoV-2
- Creazione di algoritmi di deep learning e machine learning per profiling *in silico*.

PUBBLICAZIONI

- **Maria Rita Gulotta**, Riccardo Brambilla, **Ugo Perricone**, Andrea Brancale, A Rational Design of α -Helix-Shaped Peptides Employing the Hydrogen-Bond Surrogate Approach: A Modulation Strategy for Ras-RasGRF1 Interaction in Neuropsychiatric Disorders, *Pharmaceuticals* 2021, doi: 10.3390/ph14111099

- Ornella Randazzo, Stella M. Cascioferro, Camilla Pecoraro, Widad Ait Iddouch, Amir Avan, Barbara Parrino, Daniela Carbone, **Ugo Perricone**, Godefridus J. Peters, Patrizia Diana, Elisa Giovannetti, SF3B1 modulators affect key genes in metastasis and drug influx: a new approach to fight pancreatic cancer chemoresistance, *Cancer Drug Resist* 2021, doi: 10.20517/cdr.2021.61

- **Nedra Mekni**, **Claudia Coronello**, Thierry Langer, **Maria De Rosa**, **Ugo Perricone**, Support Vector Machine as a Supervised Learning for the Prioritization of Novel Potential SARS-CoV-2 Main Protease Inhibitors, *Int. J. Mol. Sci.* 2021, doi:10.3390/ijms22147714

- **Maria Rita Gulotta**, **Giada De Simone**, Justin John, **Ugo Perricone**, Andrea Brancale, A Computer-Based Methodology to Design Non-Standard Peptides Potentially Able to Prevent HOX-PBX1-Associated Cancer Diseases, *Int. J. Mol. Sci.* 2021, doi: 10.3390/ijms22115670

- **Maria Rita Gulotta**, Serena Vittorio, Rosaria Gitto, **Ugo Perricone**, Laura De Luca, Exploring molecular contacts of MUC1 at CIN85 binding interface to address future drug design efforts, *Int. J. Mol. Sci.* 2021, doi: 10.3390/ijms22042208

Piattaforma di Ingegneria dei tessuti

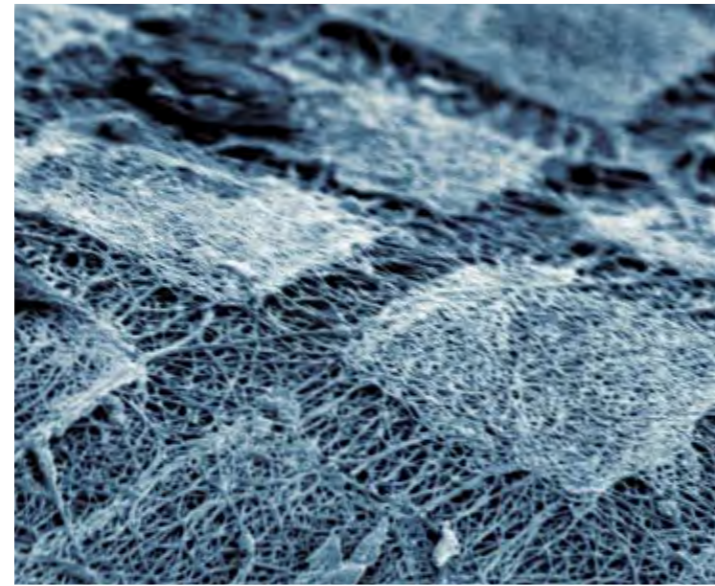


CONTATTI:
Antonio D'Amore, PhD
adamore@fondazionerimed.com

La piattaforma di ingegneria dei tessuti è impegnata su due fronti integrati della ricerca traslazionale: la ricerca di base e la ricerca applicata, in particolare in ambito cardiovascolare. Questa piattaforma consente la caratterizzazione meccanica e strutturale dei tessuti nativi e bioingegnerizzati e lo studio *in vitro* ed *in vivo* dello sviluppo di tessuto de novo. Inoltre, offre modelli strutturali deterministici per la crescita e la rigenerazione di tessuto e software customizzati per la caratterizzazione strutturale dei tessuti e per lo studio quantitativo di sezioni istologiche. Da un punto di vista traslazionale, la piattaforma di ingegneria dei tessuti si focalizza sulle applicazioni cliniche nel contesto delle malattie cardiovascolari, ponendo maggiore enfasi sullo sviluppo di medical device, sul loro posizionamento e sullo studio di meccanismi minimamente invasivi di deployment. In particolare, la piattaforma è focalizzata sullo sviluppo di cardiac patch, valvole cardiache ingegnerizzate, vascular graft e chordae tendineae bioingegnerizzate. I nuovi laboratori di ingegneria tissutale sono dotati di sistemi di ultima generazione e constano di due macro unità: la prima di biofabbricazione, la cui strumentazione include una piattaforma di bioprinting basata su un braccio robotizzato a sei gradi di libertà, strumenti per elettrofilatura ed elettrodeposizione, ed una di caratterizzazione dei materiali e costrutti ingegnerizzati che include macchinari per le prove meccaniche, per la caratterizzazione istologica e della micro e macro struttura.

PARTNERSHIPS E COLLABORAZIONI

- University of Pittsburgh (PITT), Pittsburgh, USA
- University of Pittsburgh Medical Center (UPMC), Pittsburgh (PA), USA
- Politecnico di Milano, Milano, Italia
- Advances Solutions Life Sciences (ASLS) Inc. - Louisville (KY), USA
- IRCCS ISMETT, Palermo, Italy
- UAI, Argentina
- Aten, University of Palermo
- LivaNova - Mirandola, Italia
- University of Cincinnati, Cincinnati, USA
- West Virginia University, Morgantown, USA
- Harvard Medical School, Boston, USA
- University of Campinas, Campinas Brazil
- University of Texas at Austin, Austin USA
- Telea Biotech - Tissue Engineering Biomedical Technologies, Italy
- University of Nagoya, Japan
- JOMDD, Tokyo, Japan
- Telea Biomed - Italy

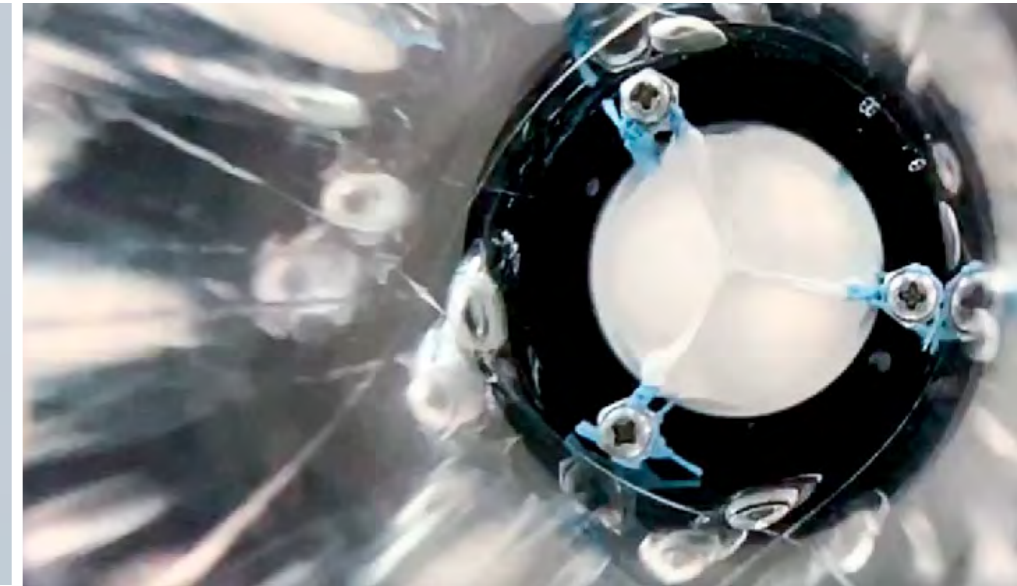


Competenze

- Sviluppo di dispositivi cardiovascolari come cardiac patch, vascular graft e heart valve;
- Sintesi di polimeri con ampio grado di degradazione per lo sviluppo di dispositivi medici;
- Decellularizzazione di organi;
- Caratterizzazione strutturale ed istologica di tessuti nativi ed ingegnerizzati;
- Sviluppo e prototipazione di sistemi per il posizionamento ed impianto in modalità minimamente invasiva dei dispositivi medici;
- Modellazione dei fenomeni che regolano la crescita e la rigenerazione del tessuto.

Dotazione tecnologica

- Modelli numerici predittivi per la crescita e la rigenerazione del tessuto;
- Software per analisi quantitativa di sezioni istologiche;
- Software per la generazione di reti fibrose stocasticamente generate;
- Metodi innovativi di analisi morfologica di materiali micro e nano-strutturati;
- Sviluppo ed ottimizzazione di valvole cardiache ingegnerizzate tramite l'uso di un braccio robotico a sei gradi di libertà;
- Apparat per elettrodeposizione con e senza mandrino;
- Strumentazione per la caratterizzazione meccanica dei dispositivi ingegnerizzati in seno ai progetti TECP, TEHV e TEVG.



PROGETTI DI RICERCA ATTIVI

- Sviluppo di un sistema di impianto minimamente invasivo di valvole cardiache
- Sviluppo di un sistema di impianto minimamente invasivo di patch cardiaco
- Studio di proprietà meccaniche, morfologiche e resistenza alla deposizione piastrinica di un patch cardiaco ottenuto da pericardio in associazione con la compagnia ADEKA
- Sviluppo di un graft vascolare a 3 strati per limitare l'iperplasia dell'intima e promuovere l'endotelizzazione.

PUBBLICAZIONI

Publicati

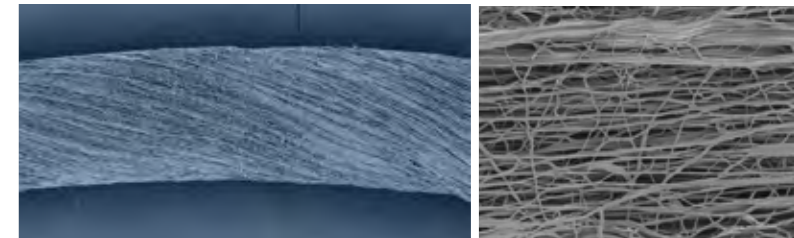
[J. A. 2] L. M. Silveira-Filho, G. Cohan, **A. Adamo**, S. K. Luketich, G. Menallo, A. D'Amore, W. R. Wagner. 2021 Can a biohybrid acellular patch salvage ventricular function at late time point post-infarction remodeling process? Journal of American College of Cardiology Basic Trans. Science, 6 (5), 447-463 IF 3.7.

[J. A. 1] 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. 2021 A Cell-free Biodegradable Synthetic Artificial Ligament for the Reconstruction of Anterior Cruciate Ligament (ACL) in a Rat Model. Acta Biomaterialia, 121, 275-287, 5Y-IF 7.16.

Sottomessi al giornale

[J. A. 4] Y. Matsumura, L. M. Silveira-Filho, G. Cohan, **A. D'Amore**, W. R. Wagner. Elastomeric tissue engineered template based tricuspid valve. To be submitted to J. of Thoracic and Cardiovascular Surgery, IF 4.88.

[J. A. 3] 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.



[J. A. 2] S. K. Luketich, G. Menallo, G. Nasello, M. Maneschi, F. Gulizzi, P. Livreri, W. R. Wagner, and **A. D'Amore**. Controlling in-plane mechanics of electrospun polyurethane scaffolds for cardiac tissue engineering applications. To be submitted to Journal of Mechanical Behavior of Biomedical Materials, IF: 3.23.

[J. A. 1] **A. Adamo**, J. Bartolacci, M. Traina, A. Pantano, G. Gherzi, W. Wagner, S.F. Badyak, A. D'Amore. Bioprocessing, structure, mechanics and evaluation of micro-fiber based biodegradable suture material. Submitted to Biomaterials, 5Y-IF 8.97.

Piattaforma di Proteomica

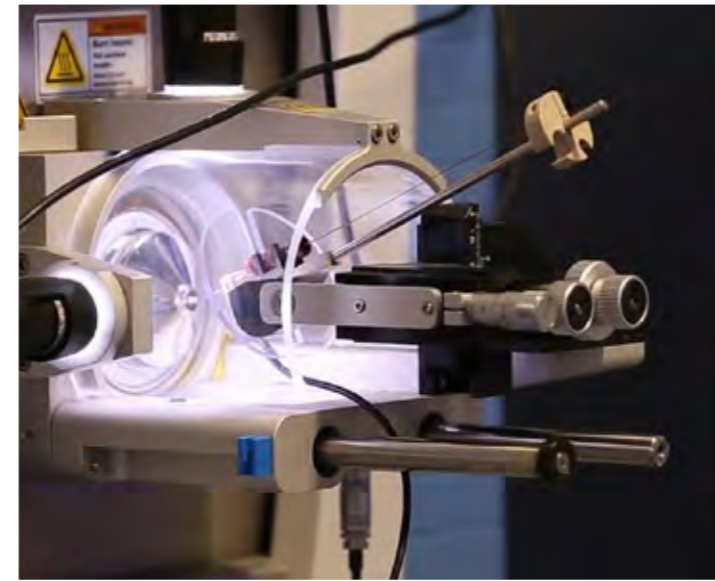


CONTATTI:
Simone Dario Scilabra, PhD
sdscilabra@fondazionerimed.com

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.

PARTNERSHIPS E COLLABORAZIONI

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



Competenze

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

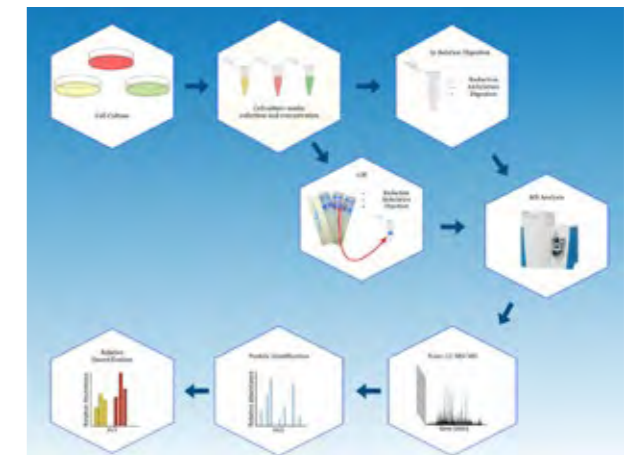
presenti in tutte le cellule nucleate e svolgono un ruolo fondamentale nell'esporre gli antigeni peptidici per il loro riconoscimento da parte delle cellule del sistema immunitario innato. Grazie all'utilizzo della proteomica quantitativa abbiamo scoperto che i livelli iRhom2 regola il rilascio ADAM17-dipendente delle molecole di classe I. Studiare le conseguenze funzionali *in vivo* di questo meccanismo di regolazione sono l'obiettivo principale di questo progetto.

Studio del ruolo di iRhom2 nella regolazione delle molecole di istocompatibilità di classe I e responsività dell'adenocarcinoma pancreatico all'immunoterapia

L'adenocarcinoma pancreatico è uno dei tumori più aggressivi e generalmente resistente all'immunoterapia. Una delle cause maggiori della resistenza all'immunoterapia dell'adenocarcinoma pancreatico è la mancanza di espressione delle molecole di classe I, quindi, terapie che inducono l'espressione di tali molecole potrebbero migliorare la risposta dell'adenocarcinoma pancreatico all'immunoterapia. Questo progetto si propone di studiare la funzione della proteina iRhom2, un regolatore di ADAM17 e STING, nell'adenocarcinoma pancreatico e nella risposta di questo tumore alle terapie immunoterapiche.

PUBBLICAZIONI

- Spanò D. P. and Scilabra S. D.; Tissue inhibitor of metalloproteases 3 (TIMP-3): *in vivo* analysis underpins its role as a master regulator of ectodomain shedding, Membranes, in press.
- 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.
- Yamamoto K, de Groot R, Scilabra SD, Kwok HF, Santamaria S. Editorial: ADAM, ADAMTS and Astacin Proteases: Challenges and Breakthroughs in the -Omics Era. *Front Mol Biosci*. 2021 Oct 12;8:780242. doi: 10.3389/fmolb.2021.780242. PMID: 34712699; PMCID: PMC8546316.
- Carreca AP, Pravatà VM, D'Apolito D, Bonelli S, Calligaris M, Monaca E, Müller SA, Lichtenthaler SF, Scilabra SD. Quantitative Proteomics Reveals Changes Induced by TIMP-3 on Cell Membrane Composition and Novel Metalloprotease Substrates. *Int J Mol Sci*. 2021 Feb 27;22(5):2392. doi: 10.3390/ijms22052392. PMID: 33673623; PMCID: PMC7957584.



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 sottoporre le proposte - anche in collaborazione con altri enti - e gestire i rapporti con le amministrazioni titolari dei programmi di finanziamento, nonché di coordinare e supervisionare i progetti approvati.

Nel corso dell'anno 2021 sono proseguite le attività relative ai 8 progetti pluriennali finanziati nel 2019 e nel 2020 ed in corso di svolgimento. Il 2021 ha visto l'ammissione a finanziamento di 2 nuovi progetti, a valere su finanziamento nazionale (**FISR-MUR COVID 19 e MISE**).

Si evidenzia che l'anno 2021 segna il passaggio a un nuovo ciclo di programmazione che coprirà il prossimo settennio 2021-2027 e, a seguito del periodo pandemico, l'avvio di un programma di transizione a copertura del triennio 2021-2023, attraverso il Piano Nazionale di Ripresa e Resilienza (PNRR). L'Area Grant ha concentrato le attività sull'approfondimento dei requisiti di partecipazione all'offerta delle opportunità di finanziamento, dettati dai nuovi Piani Programmatici europei, nazionali e regionali.

Tra le attività del 2021 volte all'ottenimento di finanziamenti per la ricerca, va segnalata la sottomissione di 1 progetto a valere su bando europeo HORIZON, 3 progetti di Ricerca e Sviluppo su finanziamenti nazionali (Ministero Salute e MUR) e 2 progetti su Fondazioni di erogazione.

Inoltre, sono state presentate 13 proposte di Dottorati Innovativi e Green su fondi PON 2014-2020 - REACT-EU, in partnership con l'Università di Palermo.



Progetti scientifici in corso di svolgimento nel 2021



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.

PROGEMA

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

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

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

OBIND

Oncological therapies through Biological Interaction Network Discovery

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

Il progetto è focalizzato allo studio e l’individuazione delle interazioni biologiche che influenzano le patologie tumorali, grazie all’utilizzo di nuovi approcci statistici e computazionali per il data proces-

sing e all’applicazione di modelli di analisi integrata di dati provenienti da differenti sorgenti.

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 cardiaco e il collegamento del ventricolo sinistro con i lembi della valvola.

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.

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.

iRhom2- a new therapeutic target in osteoarthritis

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

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

4FRAILTY

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

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

L’obiettivo è quello di realizzare uno strumento computazionale per simulare la piattaforma sensoriale nel suo insieme di sensori e quindi di parametri vitali ed ambientali che saranno raccolti 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.

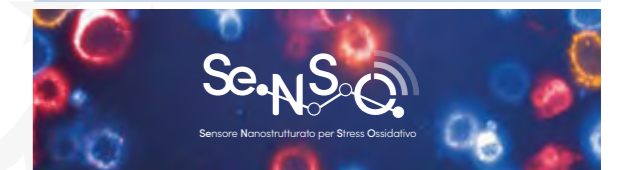


Progetto SE.N.SO

Sensore strutturato per Stress Ossidativo

ASSE OT1 - AZIONE 1.1.5 “Sostegno all’avanzamento tecnologico delle imprese attraverso il finanziamento di linee pilota e azioni di validazione precoce dei prodotti e di dimostrazione su larga scala”

Beneficiari:	
Impresa capofila:	DIPIETRO GROUP srl
Partner industriali:	CERTY CEO srl; MICROSYSTEMS srl; RULETECH srl;
Organismi di Ricerca:	Università degli Studi di Palermo; IRIB/CNR: Istituto di Biomedicina ed Immunologia Molecolare; Fondazione Ri.MED
Importo dell’intervento:	3.467.224,38€
Quota Fondazione Ri.MED	390.550,00€
Data di inizio intervento:	12/01/2021
Data prevista fine intervento:	11/07/2023



Progetti scientifici ammessi a finanziamento nel 2021



NABUCCO

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

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

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

Il progetto è stato approvato nel 2020 ma per problemi tecnici avvierà le attività progettuali nel 2022

SENSOMAR

Sensore nano-strutturato per stress ossidativo integrato in mascherina per valutazione in remoto.

Fondi FISR/MUR 2020. Soggetto capofila IRIB-CNR e IFC-CNR, partner, Università di Palermo; la Fondazione RiMED partecipa come soggetto di supporto al CNR.

La proposta mira allo sviluppo di una metodologia originale e di un dispositivo innovativo, economico e miniaturizzato per il monitoraggio dei pazienti affetti da patologie respiratorie attraverso la rilevazione non invasiva del perossido di idrogeno (marker di SO) nell'esalato respiratorio. Il dispositivo, integrato su una mascherina, si interfaccia con un sistema remoto e fornirà informazioni sull'evolversi della malattia ai soggetti coinvolti nella filiera sanitaria.

EIDH

European Digital Innovation Hub.

Adesione della Fondazione alla candidatura regionale, con capofila il Parco Tecnologico della Sicilia, alla rete dei Poli per la Digital Transformation Europea (Programma Europa Digitale).

Il network prende il nome di European Digital Innovation Hubs (Edih) e ha l'obiettivo di garantire la transizione digitale della PA e dell'industria mediante l'adozione di tecnologie avanzate (Cyber security, Intelligenza Artificiale, High Performance Computing).

La candidatura è stata approvata dal MISE, si attende l'apertura della negoziazione con l'UE.

Progetti scientifici sottomessi nel 2021



Progetto regionale: HUB BIO-INNAVATHE, BIG & OPEN DATA FOR INNOVATIVE THERAPIES

Bando Nazionale Piano Operativo Sanitario - POS 2014-2020 - Traiettorie 4 "Biotecnologia, bioinformatica e sviluppo farmaceutico".

Il progetto si pone l'obiettivo di costituire il primo Hub interregionale per le Scienze della Vita. L'Hub consentirà di sperimentare nuove terapie innovative e di portare sul mercato nuovi prodotti, oltre ad avviare un ambizioso programma di Alta Formazione.

Soggetto capofila: IRCCS-ISMETT, diversi soggetti partner nazionali dell' HUB BIO-INNAVATHE. Il progetto coinvolge la Fondazione Ri.MED attraverso la collaborazione scientifica con soggetti della rete.

Progetto regionale: Genesis-Ati

Studio degli eventi GENETICI alla base della Carcinogenesi in aree ad Alto Tasso di Inquinamento per tipologia produttiva.

Bando Nazionale Piano Operativo Sanitario - POS -2014-2020 – Traiettorie 3 "Medicina rigenerativa, predittiva e personalizzata".

Soggetto capofila: ARPA Sicilia, partner UNIPA, INFN, USL Ragusa. Il progetto coinvolge la Fondazione Ri.MED attraverso la collaborazione scientifica con l'INFN.

Dissecting the role of iRhom2 in the autophagy of MHC-I molecules to enhance responsiveness of PDAC to immunotherapy.

Bando Fondazione AIRC. Fellowships Call for applications 2021.

Ricercatore Responsabile: Simone Scilabra

Introduzione di applicazione degli strumenti avanzati di stampa 3D nell'ambito delle terapie cardiovascolari.

Bando della Banca d'Italia

Acquisto di una stampante 3D da utilizzare in attività collaborative tra il gruppo di ricerca in Bioingegneria della Fondazione Ri.MED ed i partner clinici negli enti ospedalieri locali. La disponibilità dell'attrezzatura

contribuirebbe in maniera determinante ad innalzare lo standard di cura ed assistenza delle patologie cardiovascolari, definendo protocolli terapeutici più efficaci e offrendo al paziente un'esperienza più umana e meno traumatica.

Ricercatore Responsabile Gaetano Burriesci.

PRIME

HORIZON-HLTH-2021-DISEASE-04-02: Building a European innovation platform for the repurposing of medicinal products.

Il progetto ha l'obiettivo di creare un'innovativa piattaforma di riposizionamento dei farmaci che consenta lo screening *in silico* e la definizione delle priorità di farmaci candidati per il trattamento di malattie pediatriche. La piattaforma fornirà un efficiente ambiente di ricerca e sviluppo in cui gli utenti avranno accesso immediato a un sistema di database e servizi integrati oltre che strumenti di valutazione della normativa per il riutilizzo e il riposizionamento dei farmaci in ambito pediatrico.

Il progetto è stato promosso da una partnership europea con capofila Consorzio per le Valutazioni Biologiche e Farmacologiche (IT). La Fondazione RiMED partecipa al progetto come "third party" del CNR.

Ricercatore Responsabile Chiara Cipollina.

REACT-EU. Dottorati Innovativi e Green

Fondi PON 2014-2020

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

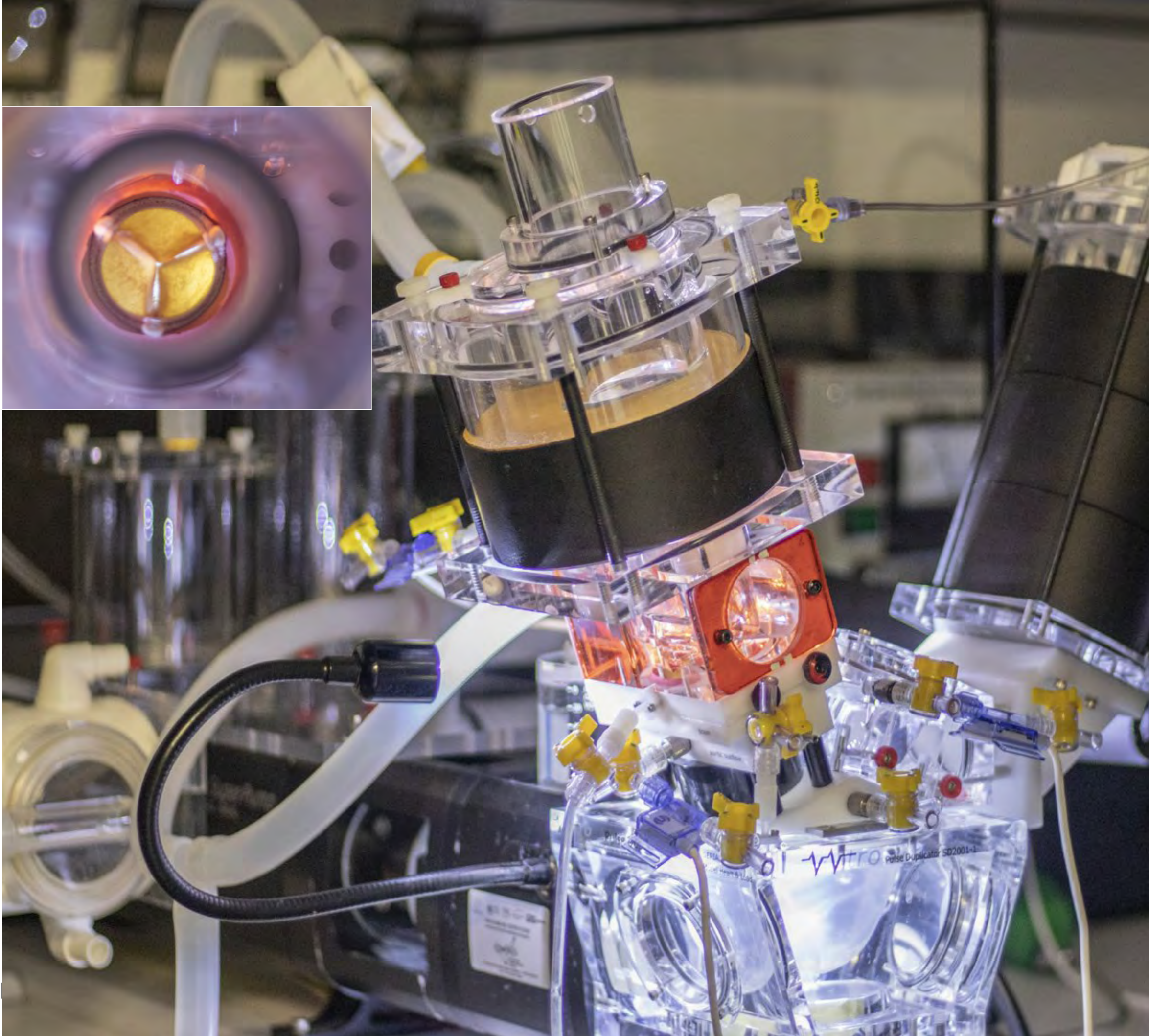
L'UNIPA in partnership con la Fondazione (in qualità di soggetto deputato all'attività pratica) hanno sottomesso le domande per 13 progetti di Dottorati Innovativi.

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.

Nel 2021, inoltre, la Fondazione ha finalizzato un importante contratto di licenza e collaborazione scientifica con una multinazionale operante nel settore cardiovascolare, avente ad oggetto lo sviluppo di una intera famiglia brevettuale della Fondazione, che vede tra gli inventori Gaetano Burriesci, Group Leader di Bioingegneria della Fondazione, e che è costituita da due brevetti aventi ad oggetto due valvole cardiache e dal brevetto del correlato *delivery system*.





Portfolio Brevetti al 31.12.2021

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

Hybrid Micro Molding-Fiber Deposition Substrate Processing for Cell Biology Manipulation and Local Anisotropy
US 63/091,462

Fondazione Ri.MED - Università di Pittsburgh

Double components mandrel for electrospun stentless, multi-leaflet valves fabrication
WO2016138416

Fondazione Ri.MED - Università di Pittsburgh

Retrievable self-expanding non-thrombogenic lowprofile percutaneous atrioventricular valve prosthesis
WO2016138423

Fondazione Ri.MED - Università di Pittsburgh

Multi-layered graft for tissue engineering applications
WO2019023447

Fondazione Ri.MED - Università di Pittsburgh

Treating soft tissue via controlled drug release
WO2015134770

Fondazione Ri.MED - Università di Pittsburgh

Microfluidic Tissue Development Systems
WO2017062629

Fondazione Ri.MED - Università di Pittsburgh

A modular, microfluidic, mechanically active bioreactor for 3D, multi-tissue, tissue culture
WO2015027186

Fondazione Ri.MED - Università di Pittsburgh

Recruitment of mesenchymal stem cells using controlled release systems
WO2014022685

Fondazione Ri.MED - Università di Pittsburgh

Osteoarthritis treatment with chemokine-loaded alginate microparticles

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

Fondazione Ri.MED - Università di Pittsburgh

Organ chip to model mammalian joint
U.S. Patent Appl. No. 16/193,972)

Fondazione Ri.MED - Università di Pittsburgh

Multi-well mechanical stimulation systems and incubators
WO2019079722

Fondazione Ri.MED - Università di Pittsburgh

A stentless biopolymer heart valve replacement capable of living tissue regeneration
WO2018156856

Fondazione Ri.MED - Università di Pittsburgh

An expandable percutaneous cannula

PCT/US2018/017795

Fondazione Ri.MED - Università di Pittsburgh

Biodegradable metallic - polymeric composite prosthesis for heart valve replacement

WO2019210059

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

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

US provisional Patent Application 62/874,114

Fondazione Ri.MED - Università di Pittsburgh

Valved stent for the treatment of tricuspid regurgitation

US provisional Patent Application 62/868,275

Fondazione Ri.MED - Università di Pittsburgh

Semi-rigid annuloplasty ring and method of manufacturing

WO2019220365

Fondazione Ri.MED

Heart valve prosthesis

WO2010112844

Fondazione Ri.MED

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
Aprile 2022



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