



Ministero della Salute – Direzione Generale della Ricerca e dell’Innovazione in Sanità

Rendiconto 5 per mille ANNO 2020

Contributo percepito € 361.304,38

In data 26.10.2021

Ente della Ricerca Sanitaria

Denominazione Ente:

FONDAZIONE IRCCS CA’ GRANDA OSPEDALE MAGGIORE POLICLINICO

Codice fiscale: **04724150968**

Sede legale: **Via Francesco Sforza 28 - 20122 MILANO**

Indirizzo di posta elettronica dell'ente: **protocollo@policlinico.mi.it**

Dati del rappresentante legale: **Dott. Ezio Belleri ***

TITOLO DEL PROGETTO: ISOLAMENTO DI NANOPARTICELLE NATURALI DA UTILIZZARE COME AGENTI ANTI-Infiammatori/ANTI-FIBROTICI

Resp. Scientifico: Prof. Yvan Torrente

Data di inizio progetto: 01/09/2022

Data di fine progetto: 31/08/2023

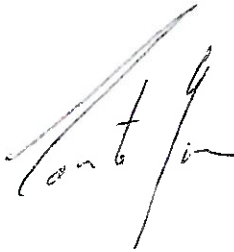
Fondi 5 per mille assegnati al progetto: € 61.304,38

Costo complessivo del progetto (se co-finanziato): €

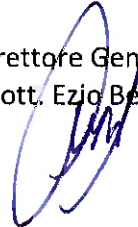
VOCI DI SPESA	COSTO COMPLESSIVO	QUOTA FINANZIATA CON FONDI 5 PER MILLE
Personale di ricerca (borse di studio)		€ 25.000,00
Apparecchiature (ammortamento, canone di locazione/leasing)		
Materiale d'uso destinato alla ricerca (per laboratori di ricerca, acquisto farmaci ecc.)		€ 36.304,38
Spese di organizzazione (manifestazioni e convegni, viaggi e missioni ecc.)		
Elaborazione dati		

Spese amministrative		
Altro (indicare quali)		
TOTALE		€ 61.304,38

Il Responsabile del Progetto
Prof. Yvan Torrente

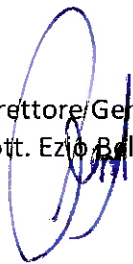


Il Direttore Generale *
Dott. Ezio Belleri



Si autorizza al trattamento dei dati ai sensi del d.lgs. 196/2003

Il Direttore Generale*
Dott. Ezio Belleri



* (per conto del Legale Rappresentante Arch. Marco Giachetti - Deliberazione Consiliare n. 21 del 30.4.2019

Titolo	ISOLAMENTO DI NANOPARTICELLE NATURALI DA UTILIZZARE COME AGENTI ANTI-INFIAMMATORI/ANTI-FIBROTICI
Background e razionale	<p>Sempre più interesse è volto allo studio del ruolo degli esosomi in condizioni fisiologiche e patologiche, il loro potenziale utilizzo in diagnosi e in terapia. Gli esosomi sono presenti in quasi tutti i fluidi biologici, tra cui urina, sangue, ascite, e nel liquido cerebrospinale, frazioni di fluidi corporei come siero e plasma, e nei terreni delle colture cellulari. Sono rilasciati dalla maggior parte dei tipi cellulari nello spazio extracellulare dopo fusione con la membrana plasmatica (Simons et al., 2009; Mathivanan et al., 2010; Gross et al., 2012). I lipidi e le proteine sono i componenti principali delle membrane esosomiali, con livelli relativamente alti di colesterolo, sfingomielinina e ceramide e particolari microdomini di membrana resistenti ai detergenti dette zattere lipidiche (lipid rafts). Oltre alle proteine coinvolte nel trasporto e nella fusione di membrane, come Rab, GTPasi, annexina e flotillina, heat shock protein (HSP), integrine e tetraspanine, tra cui CD63, CD81, CD82 (Cocucci et al., 2009) recentemente sono stati identificati diversi acidi nucleici nel lume esosomiale, inclusi mRNA, miRNA e altri RNA non codificanti (ncRNA) (Sato-Kuwabara et al., 2015). Questi RNA esosomiali possono essere assorbiti da cellule vicine o cellule distanti quando circolano gli esosomi, e successivamente modulano le cellule riceventi. La scoperta della loro funzione nello scambio genetico tra le cellule ha portato ad una crescente attenzione verso gli esosomi. Gli esosomi sono secreti sia in condizioni normali sia patologiche e da una vasta gamma di tipi di cellule (Henderson et al., 2011), tra cui cellule B e T (Zech et al., 2012), cellule dendritiche, cellule staminali mesenchimali (Lai RC et al., 2010), cellule epiteliali (Kapsogeorgou et al., 2005), astrociti (Wang et al., 2012), cellule endoteliali (Zhan et al., 2009) e cellule cancerose (Keryer-Bibens et al., 2006). Gli esosomi sono stati identificati anche nella maggior parte dei fluidi corporei tra cui l'urina ed il liquido amniotico (Keller et al., 2007), il sangue (Li et al., 2008), il siero (Almqvist et al., 2008), la saliva (Gallo et al., 2012) (Ogawa et al., 2008), il latte materno, il liquido cerebrospinale (Saman et al., 2012) e la secrezione nasale (Qiu et al., 2012). Molteplici lavori hanno dimostrato inoltre il ruolo degli esosomi nella risposta immunitaria, tumorigenesi e progressione tumorale, nella chemioresistenza e nei disordini neurodegenerativi attraverso la fusione dell'esosoma con la membrana plasmatica della cellula ricevente e conseguente rilascio del cargo nel citosol. Gli esosomi possono quindi rappresentare una valida alternativa alla terapia cellulare. Alcuni recenti studi hanno dimostrato che i miRNA non sono impacchettati in modo casuale all'interno degli esosomi. Guduric-Fuchs e collaboratori hanno analizzato i livelli di espressione dei miRNA in varie linee cellulari e negli esosomi secreti, scoprendo che alcuni miRNA entrano preferenzialmente negli esosomi (Guduric-Fuchs et al., 2012). Inoltre, alcuni studi hanno dimostrato che i livelli di espressione dei miRNA esosomiali sono alterati in diverse condizioni fisiologiche. Tutti questi studi dimostrano che le cellule d'origine possiedono un meccanismo di selezione che guida specifici miRNA intracellulari ad entrare negli esosomi. L'utilizzo di esosomi permetterebbe quindi la "riprogrammazione epigenetica" ottenibile mediante l'uso di miRNA in grado di regolare contemporaneamente pathway multipli a livello trascrizionale. Per rispondere alle esigenze di cura dei malati, è necessario che i farmaci per terapia avanzata siano prodotti in numero sufficiente, con qualità e caratteristiche riproducibili e con costi relativamente bassi. Le terapie a base di cellule sono infatti prodotti biologici complessi e sensibili all'ambiente di manifattura e che presentano una variabilità intrinseca anche in sistemi di produzione regolati finemente. Questo progetto si propone sviluppare una piattaforma per l'identificazione, validazione preclinica e traslazione GMP di prodotti cellulari o nanofarmaci innovativi, standardizzati e a bassa tossicità.</p>

<p>Obiettivi</p>	<p>Lo sviluppo del progetto verterà sull'isolamento/sviluppo di nanoparticelle (NP) naturali da utilizzare come agenti anti-infiammatori/anti-fibrotici o trasportatori di molecole con azione rigenerativa o di modulazione del microambiente infiammatorio/fibrotico.</p> <p>A tale fine verranno messe a punto metodiche per ottenere NP naturali da varie fonti cellulari, tra cui induced pluripotent stem cells (iPSCs) e cellule stromali mesenchimali isolate da tessuti di diversa origine (MSC-Exos) e metodiche per caricare nanoparticelle/farmaci all'interno di supporti cellulari attivi. Il sotto-progetto si propone di i) disegnare una sequenza metodologica per isolare/produrre, validare e standardizzare le preparazioni di NP ai fini dello sviluppo farmacologico in "Good Manufacturing Practice" (GMP) e dell'impiego clinico nell'ambito identificato. L'uso terapeutico di NP esosomiali nell'ambito della terapia dell'infiammazione acuta/cronica e della fibrosi permetterebbe di superare i limiti di impiego delle cellule intere, di cui le loro dimensioni o l'espressione di antigeni HLA che stimolano alloreattività. Gli studi in questo ambito sono ancora in fase preclinica e le applicazioni, al momento, limitate.</p> <p>Una possibile fonte di NP naturali sono le cellule staminali pluripotenti indotte (iPSC), che rappresentano una delle fonti cellulari più promettenti per strategie rigenerative in quanto possono produrre una quantità illimitata di cellule progenie che possono essere differenziate in cellule di tessuto funzionale. Sebbene la tecnologia di riprogrammazione consenta la generazione di iPSC autologhe, questo processo rimane laborioso, costoso ed associato alle caratteristiche del paziente. Le terapie cellulari allogene mirate a vaste popolazioni di pazienti potrebbero essere economicamente più fattibili se non soggette ad un rigetto immunitario. Una soluzione potrebbe essere quella di creare una linea di iPSC donatore universale, non soggetta a rigetto immunitario in quanto resa negativa per HLA di classe I mediante l'interruzione mirata del gene B2M, dalla quale isolare nanoparticelle naturali con proprietà anti-infiammatorie/anti-fibrotiche.</p> <p>La barriera principale all'impiego delle NP naturali è costituita dalla grande eterogeneità dei prodotti, e dalle difficoltà di ottenere lotti con caratteristiche riproducibili. L'obiettivo specifico di questo progetto è quello di ottenere NP esosomiali con specifica funzione anti-infiammatoria/anti-fibrotica, o di metodiche per la preparazione e la validazione di efficacia, che possano essere in seguito sviluppati clinicamente per la terapia delle patologie croniche caratterizzate da infiammazione o fibrosi. Le diverse categorie di NP saranno isolate dal surnatante di coltura mediante due ultra-centrifugazioni, la prima a 16.000 giri per un'ora permetterà di separare le extracellular vesicles; una successiva centrifugazione del surnatante a 100.000 giri per 1h consentirà il recupero degli esosomi. Questa sezione del progetto permetterà di ottenere popolazioni cellulari di qualità farmaceutica, richiesta per tutti i farmaci anche nell'ottica di una futura traslazione clinica, utilizzabili per l'isolamento di NP naturali, ma anche per futuri trials negli ambiti clinici identificati. La linea di iPSC universale potrà anche essere utilizzata nell'ambito del trattamento di patologie rare. Sarà quindi possibile mappare con precisione i pathway trascrizionali e i cambiamenti funzionali indotti dai diversi livelli di riprogrammazione epigenetica indotta da miRNA-NP. Il risultato di questa fase sarà lo sviluppo di nuovi nanofarmaci ad azione anti-infiammatoria/antifibrotica, ed il disegno di un protocollo standardizzato, automatizzato e GMP-compliant di produzione, che potrà essere in seguito ottimizzato su scala industriale in collaborazione con piccole/medie imprese.</p>
-------------------------	--

Attività previste

Contestualmente alla ricerca proposta abbiamo ampliato le nostre evidenze circa il ruolo di esosomi veicolanti oligonucleotidi antisenso (AON) nella correzione genica di cellule muscolari isolate da pazienti affetti da gravi malattie infiammatorie/fibrotiche muscolari. Gli esosomi veicolanti AON per la correzione genica del gene della distrofina sono in grado di indurre una reversione del fenotipo distrofico e una induzione di differenziamento muscolare dopo iniezione intramuscolare in modelli murini di distrofia muscolare di Duchenne (DMD). Inoltre abbiamo anche identificato le proprietà miogeniche di esosomi rilasciati da cellule staminali muscolari tramite esperimenti in vitro.

Le attività previste hanno la finalità di isolare nanoparticelle (NP) naturali da diverse fonti cellulari con funzione anti-infiammatoria/anti-fibrotica:

- Task 1.a: preparazione di esosomi da iPSC e generazione di una linea huPSC donatore universale
- Task 1.b: preparazione di esosomi da cellule stromali GMP-grade
- Task 1.c: identificazione di prodotti candidati allo sviluppo clinico tramite caratterizzazione di composizione attraverso TEM, enumerazione, assays di citofluorimetria, saggi di proteomica, trascrittomica (MirRNA analisi).
- Task 2: valutazione di potency in vitro in ambito anti-infiammatorio/ antifibrotico