

Advanced Therapy Cell Products and Precision Medicine Applications for End-Stage Organ Diseases (ATMP-P) –Anno 2018-2019

Responsabile scientifico: Prof. Pier Giulio Conaldi

Il programma è formato da tre progetti che hanno come obiettivo lo sviluppo di terapie avanzate e approcci di medicina di precisione per le insufficienze terminali d'organo, ossia per quelle patologie che compromettono in maniera significativa la funzionalità di organi vitali quali ad esempio il fegato o il polmone. Il particolare, il primo progetto propone, seguendo un approccio di medicina rigenerativa, uno studio comparativo dell'utilizzo di cellule staminali mesenchimali e/o epiteliali derivate da placenta da sole o in combinazione a un dispositivo semipermeabile e biocompatibile, per la rigenerazione epatica. Nel secondo progetto, si propone un approccio di immunoterapia, attraverso l'utilizzo di cellule dendritiche tollerogeniche isolate dal perfusato epatico di donatore cadavere, per migliorare l'efficacia dei trapianti. Infine, nel terzo progetto, tramite un approccio di medicina di precisione si intende studiare la relazione tra cambiamenti nel microbiota umano (insieme dei microorganismi presenti all'interno del corpo umano) e la progressione di alcune malattie polmonari.

Nel dettaglio il programma si compone dei seguenti progetti:

COMPARATIVE STUDY OF DIRECT USE OF PLACENTA-DERIVED MESENCHYMAL STEM CELLS (MSC) AND/OR THEIR SECRETOME VERSUS THE IMPLANTATION OF MSC INSIDE A REMOVABLE CATHETER-LIKE "BIOREACTOR" IN MODELS OF LIVER REGENERATION

Ente Finanziatore: UPMC Overseas

PI: Miceli Vitale

Budget complessivo del progetto: \$ 200.000,00

Durata: 12 mesi

Background

Le terapie cellulari a base di cellule staminali/stromali mesenchimali (MSCs) sono una potenziale alternativa al trattamento standard delle insufficienze terminali d'organo che è rappresentato dal trapianto d'organo solido (fegato, rene, cuore, polmone, pancreas). La letteratura scientifica infatti, suggerisce che queste cellule non solo possono sostituire i tessuti danneggiati, ma hanno anche proprietà anti-infiammatorie, angiogenetiche ed immunodulatorie e possono esercitare diversi effetti trofici. Fra le MSCs più studiate ci sono sicuramente quelle derivate dal midollo osseo, ma in realtà queste cellule possono derivare anche da altri tessuti tra cui placenta, cordone ombelicale, tessuto adiposo e denti. Noi abbiamo focalizzato la nostra attività di ricerca sulle cellule staminali derivate da placenta perché la placenta è un organo con caratteristiche immunologiche uniche, perché garantisce la tolleranza materno-fetale, è facilmente reperibile senza procedure invasive ed è considerato materiale biologico di scarto quindi non vincolato da problematiche di carattere etico. Dalla placenta, possono essere isolati due tipi principali di cellule staminali: le cellule staminali

mesenchimali amniotiche (hAMSCs) e le cellule epiteliali (hAESC). Entrambi i tipi cellulari, per la facilità dell'isolamento, la loro capacità di differenziarsi verso diversi *lineage* cellulari, la loro bassa immunogenicità e le loro proprietà anti-infiammatorie e pro-angiogenetiche, sono degli ottimi candidati per usi di medicina rigenerativa. Ad oggi sono stati mostrati diversi meccanismi attraverso cui le queste cellule possono svolgere questi effetti. In primo luogo, attraverso la secrezione di specifiche citochine e fattori di crescita che possono stimolare tali processi in modo paracrino, in secondo luogo, queste cellule potrebbero anche modulare la cosiddetta "nicchia staminale" del tessuto, stimolando il reclutamento di cellule staminali endogene al sito di lesione e la promozione della loro differenziazione verso il giusto *lineage* cellulare. Per questo motivo anche l'uso dei prodotti secreti dalle cellule staminali (secretoma) potrebbe avere effetti benefici per differenti applicazioni. Le cellule o i loro prodotti sono spesso infuse per via endovenosa negli attuali studi clinici, ma le cellule somministrate in questo modo spesso sperimentano scarsa vitalità dopo la somministrazione, il che può spiegare la loro limitata efficacia. Per risolvere questo problema, si è pensato all'utilizzo di un sistema rimovibile fatto da una matrice semipermeabile e biocompatibile, che permetta l'incapsulamento cellulare. Il ruolo primario dell'incapsulamento è quello di creare una barriera contro le cellule immunitarie e le molecole citotossiche, che potrebbero potenzialmente danneggiare le cellule staminali, evitando così il rigetto pur consentendo la diffusione attiva di ossigeno, micro- e macronutrienti, ormoni e altri fattori secretori attraverso la barriera. Le cellule staminali così protette sarebbero in grado di svolgere le loro funzioni attraverso il loro secretoma.

Innovazione e impatto

Il progetto prevede l'utilizzo di nuovo sistema di incapsulamento delle cellule che è costituito da una matrice semipermeabile, biocompatibile e rimovibile che consente da un lato di mantenere più a lungo vitali le cellule amministrare e dall'altro il rilascio del secretoma nel sito di interesse. Paragonando gli effetti della somministrazione delle cellule staminali da sole con quelli della somministrazione tramite incapsulamento saremo in grado di avere maggiori informazioni sul meccanismo di azione delle cellule staminali *in vivo*, e di comprendere se l'efficacia delle cellule staminali è dovuta all'azione delle cellule staminali, all'azione dell'interazione tra cellule staminali e sistema immunitario o all'azione del loro secretoma.

Obiettivi dello studio

L'obiettivo del progetto è quello di fare uno studio comparativo tra la somministrazione di cellule staminali derivate da placenta e la somministrazione delle stesse cellule incapsulate in una matrice semipermeabile e biocompatibile al fine di stabilire quale somministrazione garantisce una maggiore efficacia delle cellule in modelli di rigenerazione epatica.

Pubblicazioni/Risultati raggiunti

Questo progetto ha portato alla pubblicazione di due articoli scientifici in collaborazione con il Gruppo del Dr Gerlach dell'University of Pittsburgh:

- Comparative study of the production of soluble factors in human placenta-derived mesenchymal stromal/stem cells grown in adherent conditions or as aggregates in a catheter-like device. Miceli V, Chinnici CM, Bulati M, Pampalone M, Amico G, Schmelzer E, Gerlach JC, Conaldi PG. *Biochem Biophys Res Commun*. 2020 Jan 29;522(1):171-176.
- Effects of Mesenchymal Stem Cell Coculture on Human Lung Small Airway Epithelial Cells. Schmelzer E, Miceli V, Chinnici CM, Bertani A, Gerlach JC. *Biomed Res Int*. 2020 Mar 27;2020:9847579.

USE OF DONOR LIVER DERIVED DCreg FOR EARLY WEANING AFTER DECEASED DONOR LIVER TRANSPLANTATION

Ente Finanziatore: UPMC Overseas

PI: Badami Ester

Budget complessivo del progetto: \$ 255.000,00 (2019) - \$ XXX.XXX (2020)

Durata: 30 mesi (18 mesi 2019 + 12 mesi 2020)

Background

I pazienti trapiantati di organo solido sono soggetti a terapia immunosoppressiva per il resto della vita. I regimi di immunosoppressione sono associati ad effetti collaterali che a lungo termine causano malignità, problemi cardiovascolari, diabete, propensione allo sviluppo di malattie infettive e insufficienza renale. L'ideale forma di immunosoppressione nei riceventi di organo solido è quella di indurre nel ricevente tolleranza specifica nei confronti del donatore senza però alterare le difese immunitarie generiche e quindi la propensione allo sviluppo di infezioni. Le cellule dendritiche (DCs), cellule del sistema immunitario, se opportunamente re-dirette, possono indurre tolleranza operativa, intendendo per tolleranza operativa il mantenimento stabile e duraturo dell'organo trapiantato senza l'utilizzo di immunosoppressori. Il protocollo messo a punto dai nostri collaboratori al Thomas Starzl Transplantation Institute di Pittsburgh, prevede l'utilizzo di cellule DCs tollerogeniche (Tol-DCs) ottenute dal sangue periferico di donatore di fegato vivente. In ISMETT, la frequenza dei trapianti da donatore vivente è nettamente inferiore rispetto a quelli da donatore cadavere. Per questo motivo, per aumentare il numero di pazienti che potrebbero avere dei benefici da questo approccio terapeutico, si è pensato di applicare un protocollo analogo che prevede l'isolamento di precursori di DCs dal perfusato epatico del donatore cadavere piuttosto che dal sangue periferico del donatore vivente. Il perfusato epatico è la soluzione di lavaggio del fegato ottenuto durante le fasi di prelievo dell'organo prima del trapianto, lavaggio necessario per preservare l'integrità tissutale. Il perfusato epatico viene routinariamente scartato ma è particolarmente ricco di cellule del sistema immunitario, il che lo rende una preziosa fonte di cellule per applicazioni di immunoterapia adottiva.

Innovazione e impatto

L'induzione di tolleranza operativa, attraverso il trattamento con cellule dendritiche tollerogeniche,

nel ricevente aumenta le probabilità di successo dei trapianti e permette la riduzione degli effetti collaterali dovuti ai trattamenti con immunosoppressori nei pazienti trapiantati.

Obiettivi dello studio

L'obiettivo dello studio è quello di sviluppare ed ottimizzare una terapia cellulare utilizzando cellule dendritiche tollerogeniche (DCreg) per promuovere la tolleranza immunitaria operativa nei pazienti sottoposti a trapianto di fegato derivato da un donatore cadavere.

Pubblicazioni/Risultati raggiunti

E' stata avviata una collaborazione con i Drs Thompson and Lakkis dello Thomas Starzl Transplantation Institute di Pittsburgh. Questa collaborazione ha previsto la condivisione dei protocolli attualmente utilizzati a Pittsburgh e lo scambio di personale tra Pittsburgh e Palermo. Si prevede di avviare da un lato il processo di trasferimento tecnologico del protocollo usato a Pittsburgh a Palermo per la produzione di cellule dendritiche tollerogeniche da sangue periferico di donatore vivente di fegato e dall'altro alla prosecuzione dell'ottimizzazione del protocollo di isolamento di cellule dendritiche tollerogeniche da perfusato epatico di donatore cadavere.

ROLE OF MICROBIOME ANALYSIS IN THE MANAGEMENT OF SEVERE DISEASES OF THE RESPIRATORY SYSTEM

Ente Finanziatore: UPMC Overseas

PI: Barbera Floriana

Budget complessivo del progetto: \$ 160.000,00

Durata: 12 mesi

Background

In condizioni di salute, il microbiota mostra molteplici benefici per l'ospite umano: conferisce protezione da organismi patogeni, svolge una funzione antinfiammatoria, sintetizza vitamine essenziali e aminoacidi, regola il metabolismo dei grassi e modella lo sviluppo del sistema immunitario. Questa simbiosi benefica è mantenuta in equilibrio da diversi fattori ambientali, ma quando questo equilibrio si altera si provoca uno stato di disbiosi (alterazione nella composizione di elementi specifici del microbiota) che può contribuire alla predisposizione a una varietà di malattie umane autoimmuni, acute, croniche e sistemiche.

Nel polmone, i cambiamenti nel microbiota sono stati associati a importanti caratteristiche cliniche di malattie croniche come la frequenza di esacerbazione nella malattia polmonare ostruttiva cronica (BPCO), lo sviluppo di forme più gravi di fibrosi polmonare idiopatica e la reattività ai corticosteroidi e agli antibiotici nell'asma. Per questo motivo, la conoscenza della relazione tra i cambiamenti del microbiota e la predisposizione alle malattie potrebbe avere molte implicazioni prognostiche e terapeutiche. Lo studio di questa relazione è però più complesso in pazienti con malattie critiche come la sindrome da distress respiratorio acuto (ARDS) o nel trapianto di polmone. In questi pazienti l'omeostasi del microbiota potrebbe essere alterata anche dalle procedure invasive, dai trattamenti

farmacologici, dalla profilassi antibiotica e dalla terapia intensiva, fattori che possono aumentare anche la vulnerabilità dell'ospite all'infezione di agenti patogeni secondari, generalmente resistenti agli antibiotici. Diversi studi hanno mostrato una correlazione diretta tra cambi nel microbiota polmonare e la fisiopatologia dell'ARDS. Altri studi hanno suggerito una certa associazione tra cambiamenti del microbiota e fallimento del trapianto.

Per questo motivo, monitorare il microbiota durante il normale follow-up clinico dei pazienti sottoposti a trapianto di polmone o con ARDS potrebbe fornire importanti informazioni ai fini prognostici.

Innovazione e impatto

La conoscenza della relazione tra i cambiamenti del microbiota e la predisposizione alle malattie può avere molte implicazioni prognostiche e terapeutiche.

Obiettivi dello studio

L'obiettivo di questo progetto è studiare come si modifica il microbiota polmonare in tre diverse coorti: i) soggetti sani; ii) pazienti con ARDS; iii) pazienti trapiantati di polmone.

Pubblicazioni/Risultati raggiunti

Il principale risultato di questo progetto è stato l'ottimizzazione di un protocollo standard per l'isolamento e la caratterizzazione del microbiota sia delle vie aeree superiori che inferiori. Questo ha permesso di analizzare lo stato del microbiota in soggetti sani, pazienti con ARDS e pazienti trapiantati di polmone. Inoltre, l'esperienza acquisita nello studio del microbiota ha permesso la partecipazione a due progetti nazionali:

- Sotto-fenotipazione del rigetto polmonare cronico e identificazione precoce di coloro che rispondono al trattamento immunoregolatore (fotoferesi extracorporea): uno studio multi-Center (CHANGE Study) (Promotore: IRCCS-Policlinico San Matteo)
- Studio dell'insufficienza respiratoria nei pazienti con trapianto di polmone (IFALT). Finanziato da: Ministero dell'Istruzione e della Ricerca Universitaria (MIUR) Promotore: Università di Sassari

Advanced Therapy Cell Products and Precision Medicine Applications for End-Stage Organ Diseases (ATMP-P) –Anno 2019-2020

Responsabile scientifico: Prof. Pier Giulio Conaldi

Il programma è formato da due progetti che hanno come obiettivo lo sviluppo di terapie cellulari per il ricondizionamento del polmone ossia per migliorarne la qualità e renderlo più idoneo per il trapianto e per rafforzare le difese immunitarie in pazienti con tumori epatici. In particolare, il primo progetto studia l'uso delle cellule staminali mesenchimali ed epiteliali (MSC/ESC) derivate dalla placenta e loro prodotti (secretoma) per il ricondizionamento del polmone. Nel secondo progetto, invece si propone un approccio di immunoterapia basato su cellule Natural Killer Ingegnerizzate (CAR-NK) per pazienti con tumori epatici.

Il programma si compone dei seguenti progetti:

DEVELOPMENT OF NEW THERAPEUTIC PRODUCTS BASED ON HUMAN AMNIOTIC MESENCHYMAL STEM CELLS, INFUSED DIRECTLY OR IN BIOCOMPATIBLE SEMIPERMEABLE (BIOSEM) DEVICES, FOR IMPLEMENTATION OF EX-VIVO LUNG PERFUSION (EVLP) TECHNIQUES.

Ente Finanziatore: UPMC Overseas

PI: Miceli Vitale

Budget complessivo del progetto: \$ 200.000,00

Durata: 12 mesi

Background

.....

Innovazione e impatto

.....

Obiettivi dello studio

.....

Pubblicazioni/Risultati raggiunti

CAR-NK CELLS ENGINEERING FOR HEPATOCARCINOMA CELL THERAPY

Ente Finanziatore: UPMC Overseas

PI: Badami Ester

Budget complessivo del progetto: \$ 320.000,00 (in questo budget c'è anche la parte del progetto DCs)

Durata: 12 mesi

Background

L'epatocarcinoma cellulare (HCC) rappresenta la quinta causa di malignità e la seconda causa di mortalità da tumore nella popolazione di maschi adulti. In molti casi, l'epatocarcinoma è associato a epatite cronica e cirrosi causata da infezioni da virus dell'epatite B o dell'epatite C. I trattamenti per HCC includono epatectomia, trapianto di fegato o chemioterapia ma questi spesso non sono efficaci per forme avanzate di HCC e il rischio di recidiva è comunque elevato. Per questo motivo, abbiamo pensato di focalizzare il nostro progetto sullo studio di un approccio innovativo di immunoterapia per il trattamento di questo tumore. Le cellule Natural Killer (NK) svolgono un ruolo importante nella risposta immunitaria innata dell'ospite contro virus e tumori e studi hanno dimostrato una correlazione tra la funzione delle cellule NK nel sangue periferico e nel fegato e tassi di recidiva e sopravvivenza dei pazienti con HCC resecabile. Le cellule NK quindi svolgono un ruolo importante per la modulazione della risposta immunitaria del fegato e dei meccanismi di difesa immunologica contro HCC. Diversi studi clinici hanno dimostrato l'efficacia delle cellule NK allogene nell'immunoterapia adottiva per i tumori solidi, tra cui HCC. Inoltre, sono state recentemente sviluppate tecniche di ingegnerizzazione per migliorare la specificità e la citotossicità delle cellule NK per le cellule tumorali. Ad esempio, l'approccio che utilizza recettori chimerici di antigene (CAR) per le cellule T è stato applicato anche alle cellule NK. Le cellule CAR-NK hanno diversi vantaggi rispetto alle cellule CAR-T. Le cellule CAR-NK infatti riducono i rischi di risposta autoimmune e trasformazione neoplastica perché hanno una vita più breve rispetto alle cellule CAR-T. Inoltre, le citochine rilasciate dalle cellule NK, come IFN- γ e il fattore di stimolazione della colonia granulocite-macrofago (GM-CSF), sono considerate più sicure della tempesta di citochine che deriva dalla terapia cellulare con CAR-T. A differenza delle cellule CAR-T, le cellule CAR-NK mantengono una intrinseca capacità di riconoscere e colpire le cellule tumorali attraverso i loro recettori nativi.

In questo studio, proponiamo l'uso di un nuovo costrutto CAR-NK ingegnerizzato in modo da combinare la specificità di un antigene associato al tumore (TAA) descritto in HCC e la produzione di una citochina specifica che, secondo i nostri dati preliminari, ha dimostrato migliorare significativamente la risposta delle cellule NK a tumori e infezioni.

Innovazione e impatto

L'ingegnerizzazione delle cellule NK consente di migliorare l'efficacia di queste cellule come immunoterapia per l'epatocarcinoma.

Obiettivi dello studio

L'obiettivo di questo progetto è l'ottimizzazione del protocollo di produzione di cellule NK ingegnerizzate con recettori CAR (CAR-NK) al fine di aumentare la loro efficacia per il trattamento dell'epatocarcinoma.

Pubblicazioni/Risultati raggiunti

Il principale risultato di questo progetto è stato il disegno e la realizzazione del costrutto ingegnerizzato CAR che è stato successivamente trasdotto in linee cellulari (NK92) e in cellule primarie NK.