

I progetti finanziati dalla Fondazione per il triennio 2025-2027

Il progetto complessivo approvato per il triennio 2025-2027 e denominato “**Bone Pathophysiology from Mechanisms to Application**” si propone di capitalizzare gli sforzi fatti negli studi precedenti e si basa sulla visione di interazioni sinergiche produttive tra le due istituzioni, *Fondazione Humanitas per la Ricerca (FHR)* e *Istituto di Ricerche Farmacologiche Mario Negri (IRFMN)*. Questo progetto è suddiviso in 5 Progetti specifici come di seguito delineato.

Una prima linea di interventi sarà rivolta alla costruzione di una piattaforma tecnologica comune dedicata alla realizzazione di organoidi dell'osso. Questa linea di studio, si giova del background disponibile presso Humanitas nel campo delle cellule staminali pluripotenti indotte (iPSc) e dello sviluppo di organoidi e rappresenta un approccio ad alto rischio. Se vi saranno risultati positivi, questa piattaforma sarà utilizzata per condurre studi fondamentali volti a chiarire il ruolo dei componenti della matrice e delle molecole di difesa innata nella fisiopatologia ossea.

Di conseguenza, prevediamo di studiare l'azione dei glucocorticoidi (GC) sull'osso, al fine di fornire una base per un migliore sfruttamento di questi preziosi agenti terapeutici. Verrà studiato il possibile effetto del trattamento GC nella formazione di metastasi ossee osteolitiche e il valore terapeutico degli inibitori del recettore GC (GR) come agente di protezione ossea; gli agenti antimetastatici saranno valutati in modelli sperimentali presso IRFMN. Nelle indagini passate in FHR, si è osservato che GC regola MS4A4A e questo è rilevante in una condizione caratterizzata da una erosione dell'osso come nell'artrite reumatoide. Questi studi saranno ulteriormente continuati a livello preclinico e clinico.

Quanto fatto nei progetti precedenti, relativamente al potenziale diagnostico e il prognostico di proteine e geni selezionati nelle infezioni della protesi articolare (PJI, una forma comune di osteomielite), sarà ulteriormente sviluppato. A questo proposito, uno studio di convalida sarà condotto prospetticamente su un gruppo di pazienti con artroplastica totale del ginocchio e dell'anca con elevato rischio di PJI. In questo progetto, saranno studiati nuovi componenti della matrice ossea e delle molecole innate di difesa (oltre a quelle studiate in passato) incluso il sistema che è emerso nel precedente progetto come attore chiave nell'osteomielite, ovvero il sistema del complemento. In effetti, si integreranno questi studi sui pazienti con un lavoro preclinico volto a caratterizzare il ruolo nelle infezioni ossee in due principali sottotask: (i) *sperimentazione animale* (basato su modelli OM nei topi geneticamente modificati) e (ii) approccio "*disease-in-a-dish*" (usando attuali modelli sperimentali in 3D).

Dal punto di vista farmacologico durante questi anni in IRFMN, sono stati progettati e sviluppati nanoparticelle e i farmaci coniugati ad anticorpi (ADC) per terapie sull'osso e saranno testati ulteriormente in modelli *ad hoc in vivo*. Inoltre, si amplierà la prospettiva analizzando il contributo dei metaboliti batterici provenienti dal microbiota intestinale (GM) sull'omeostasi ossea e sul *crosstalk* con le cellule tumorali.

Progetto 1. Generazione di sistemi avanzati di coltura cellulare 2D e 3D /FHR e IRFMN)

Il progetto di ricerca ambisce a sviluppare sistemi avanzati di coltura cellulare 2D e 3D, con particolare



riguardo agli organoidi. Questi ultimi sono tessuti tridimensionali miniaturizzati derivanti da cellule staminali che riproducono parzialmente l'architettura e la funzione dell'organo originale. Gli organoidi rappresentano uno strumento promettente per studiare lo sviluppo dei tessuti, analizzare meccanismi patogenetici, valutare la risposta ai farmaci e sviluppare modelli paziente-specifici.

Questo progetto prenderà le mosse da cellule staminali pluripotenti indotte (iPSC) umane, già caratterizzate, e farà leva sull'expertise nel campo della biologia ossea e delle cellule staminali presente in Humanitas, avvalendosi soprattutto del supporto tecnico e scientifico di biologi cellulari con esperienza nella riprogrammazione e nel

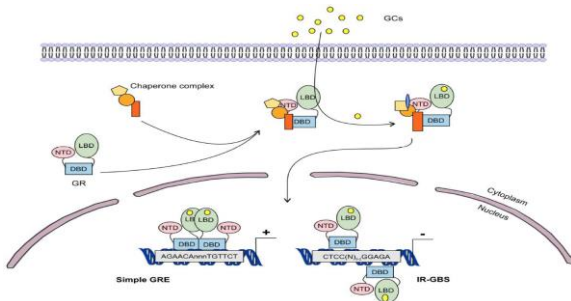
differenziamento *in vitro* di iPSC. L'applicazione della tecnologia degli organoidi al tessuto osseo è molto recente e in fase di standardizzazione.

La proposta progettuale rappresenta quindi una sfida complessa ma potenzialmente di grande impatto traslazionale quale piattaforma tecnologica trasversale alle proposte di ricerca dei team di FHR ed MN.

Progetto 2: Glucocorticoidi e tessuto osseo (IRFMN) e FHR

2A. Degradazione del tessuto osseo e metastasi ossee (IRFMN)

Presso l'Istituto Mario Negri sono stati condotti studi finalizzati alla comprensione dei meccanismi molecolari sottesi alle metastasi ossee osteolitiche.



Tale linea di ricerca si è concentrata su diversi aspetti di questo microambiente. In primis, vi è stato un focus sulla dormienza delle cellule tumorali, utilizzando un modello sperimentale basato su cellule mammarie 4T1.2. È stato, quindi, analizzato il rimodellamento osseo, studiando i meccanismi di osteoclastogenesi ed i processi di differenziamento degli osteoblasti. Particolare attenzione è stata, infine, dedicata alla Trombospondina-1 (TSP-1), con la scoperta dell'asse TSP/CD47/integrine quale meccanismo chiave nell'induzione della dormienza cellulare, aprendo nuove prospettive nella comprensione delle dinamiche delle metastasi ossee. Questi meccanismi saranno ulteriormente studiati nel triennio 2025-2027.

Verrà studiato in particolare un tema cruciale in oncologia: il ruolo dei glucocorticoidi nella degradazione ossea e nelle metastasi ossee. I glucocorticoidi, ormoni steroidei utilizzati nel trattamento di diverse malattie, mostrano un'azione complessa nel contesto oncologico. Essi vengono impiegati come agenti antineoplastici e per mitigare gli effetti collaterali della chemioterapia; tuttavia, possono paradossalmente supportare lo sviluppo tumorale. La proposta di ricerca mira proprio a studiare i meccanismi

d'azione dei glucocorticoidi nelle metastasi ossee, con lo scopo di ottimizzare i trattamenti e sviluppare nuovi inibitori in grado di prevenire il riassorbimento osseo patologico e le metastasi.

In particolare, utilizzando un modello di carcinoma mammario murino, ci si propone di valutare l'impatto di farmaci come *mifepristone* e *relacorilant* nonché di nuovi inibitori del recettore dei glucocorticoidi sul rimodellamento osseo, sulle funzioni delle cellule tumorali e sulla formazione di metastasi. Risultati preliminari mostrano effetti su proliferazione, risposta chemioterapica e dormienza cellulare.

2B. MS4A4A, un gene sensibile ai glucocorticoidi, nell'artrite reumatoide (FHR)

La proposta di studio è incentrata sul ruolo della proteina MS4A4A nel contesto dell'artrite reumatoide. Membro della famiglia delle tetraspannine, MS4A4A si distingue per essere espressa durante la maturazione dei monociti a macrofagi, soprattutto a seguito di stimolazione con IL4.

L'espressione di MS4A4A è fortemente regolata dai glucocorticoidi e risulta particolarmente significativa nel tessuto sinoviale dei pazienti affetti da artrite reumatoide. È stato, inoltre, osservato che questa proteina è principalmente presente nei macrofagi del tessuto sinoviale ed è modulata in risposta a stimoli infiammatori. La proposta di studio, che coinvolge ricercatori provenienti anche da istituzioni internazionali, si propone di esplorare ulteriormente il ruolo di questa tetraspannina. Gli obiettivi principali includono la valutazione del suo coinvolgimento nei modelli preclinici di artrite, l'analisi della risposta terapeutica ai corticosteroidi e lo studio del suo ruolo nella biologia delle cellule ossee.

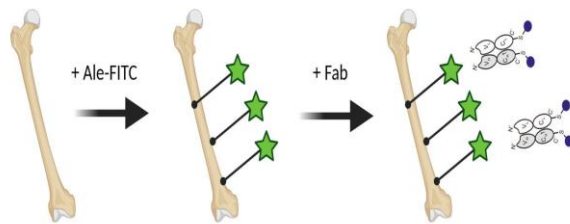
Gli studi traslazionali futuri mireranno a comprendere la relazione tra l'espressione di MS4A4A e i parametri clinici dei pazienti, nonché a indagare più approfonditamente il ruolo delle cellule immunitarie nel tessuto sinoviale.

Progetto 3. Sistemi innovativi di somministrazione dei farmaci (IRFMN)

La ricerca in corso si è focalizzata su due strategie principali: nanoparticelle di organosilica mesoporose e un sistema modulare con anticorpi coniugati a farmaci. Gli esperimenti si sono concentrati principalmente sul tumore triplo negativo del seno (TNBC) che metastatizza alle

ossa, utilizzando il farmaco R848. I risultati preliminari sono promettenti, con particolare riguardo alle nanoparticelle mesoporose che non mostrano tossicità, prolungano la vita del farmaco nel tumore osseo e riducono la crescita tumorale.

Gli esperimenti hanno evidenziato che queste nanoparticelle vengono internalizzate dai macrofagi e possono attivare queste cellule, causando la morte delle cellule tumorali.



Per la seconda strategia, ci si è avvalsi di una piattaforma tecnologica che combina coniugati alendronato-FITC e frammenti di anticorpi funzionalizzati con fluorofori. Sono state, al riguardo, condotte analisi di interazione biomolecolare mediante risonanza plasmonica di superficie (SPR) che hanno mostrato alta affinità del legame di frammenti di anticorpo a coniugati FITC.

La proposta progettuale per il prossimo triennio prevede esperimenti di efficacia *in vivo*, inclusi test di tossicità e lo sviluppo di nuove strategie terapeutiche combinate.

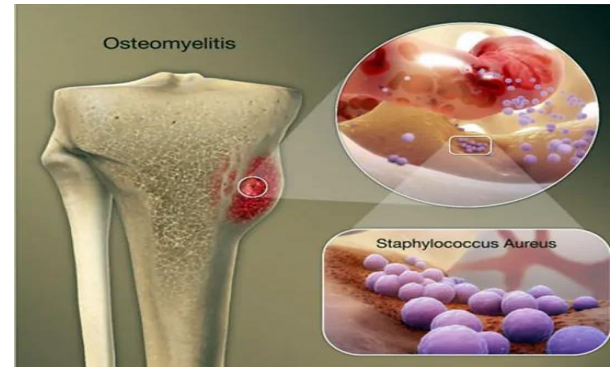
Progetto 4. Marcatori genetici e proteici dell'infezione della protesi (FHR)

La proposta di studio clinico multicentrico e prospettico è finalizzata all'identificazione di nuovi marcatori prognostici e diagnostici dell'infezione della protesi osteoarticolare (PJI), una complicanza grave in chirurgia ortopedica con un importante impatto clinico ed economico.

Questa proposta origina da evidenze generate negli studi precedenti in cui è stato dimostrato che i livelli di PTX3 nel liquido sinoviale sono associati con elevata specificità a PJI e che la variabilità genetica in *IL-1 β* correla con l'insorgenza dell'infezione in soggetti cui sono state impiantate protesi di anca e/o ginocchio.

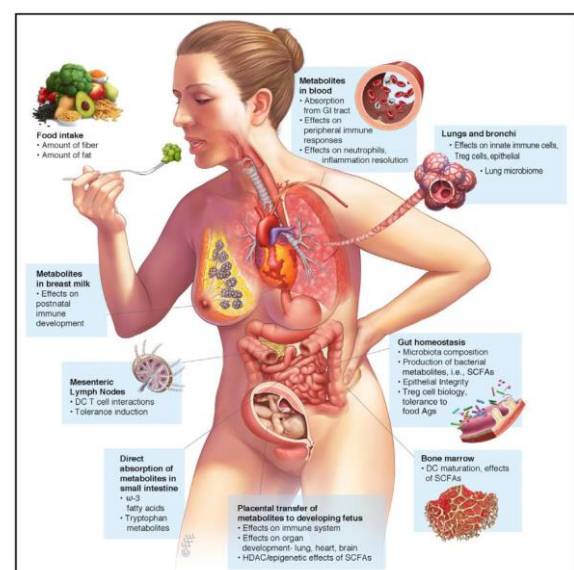
Nel nuovo studio ci si pone, quindi, due obiettivi specifici: *i*) validare PTX3 quale marcatore di PJI, ovvero verificare in una coorte indipendente di soggetti a rischio l'associazione tra PJI e concentrazione della proteina nel liquido sinoviale

valutando allo stesso tempo l'effetto di polimorfismi nel gene *PTX3*, e *ii*) identificare nuovi (in aggiunta a *PTX3*) profili biochimici e genetici utili alla definizione del rischio ed alla diagnosi di PJI.



Progetto 5. Nuovi players: Studi preclinici 5A. Ruolo dei metaboliti microbici nell'omeostasi ossea e nell'interazione dell'osso con le cellule tumorali (IRFMN)

Nei precedenti studi è stato posto l'accento sul microbiota intestinale e il suo ruolo nei processi biologici e patologici, con particolare attenzione alle interazioni tra intestino, sistema immunitario e tessuto osseo. Il microbiota, composto da batteri, funghi, protozoi e virus, svolge funzioni cruciali nel nostro organismo, dal miglioramento della digestione alla sintesi di vitamine essenziali, fino alla modulazione del sistema immunitario e nervoso centrale. È noto che metaboliti prodotti dal microbiota intestinale, specialmente gli acidi grassi a catena corta (SCFAs), hanno effetti significativi sulle cellule immunitarie e sul comportamento dei tumori.



Alcuni studi hanno evidenziato come l'alterazione del microbiota possa influenzare lo sviluppo di metastasi ossee, l'efficacia dei trattamenti immunoterapici e perfino la densità ossea.

Viene quindi proposta una nuova linea di ricerca finalizzata a comprendere l'impatto dei metaboliti intestinali su osteoclasti e osteoblasti, studiare i loro effetti su linee cellulari di tumori ossei e mammari, e valutarne il ruolo nell'interazione tra cellule dell'osso e tumorali.

Obiettivo generale dello studio è capire se e come questi metaboliti possano essere utilizzati per migliorare le terapie esistenti, aprendo nuove prospettive nel trattamento di malattie ossee e tumori.

5B. Ruolo del sistema del complemento nell'osteomielite batterica (FHR)

La proposta di studio preclinico mira a caratterizzare il ruolo del complemento, un sistema fondamentale dell'immunità innata, nelle infezioni batteriche dell'osso. Questa proposta trae ispirazione da evidenze prodotte negli studi precedenti.

A tal riguardo, avvalendosi di un modello sperimentale murino che riproduce l'infezione ossea umana da *S. aureus* (SA), è stato scoperto che PTX3 svolge un ruolo inaspettato: prodotta nell'osso durante la fase acuta dell'infezione, questa proteina agisce come mediatore antinfiammatorio, paradossalmente favorendo la colonizzazione microbica del tessuto muscolo-scheletrico.

Infatti, il deficit genetico di PTX3 nel modello murino si associa ad una patologia meno grave, con ridotta carica batterica nell'osso e minore infiammazione sistemica. Analisi proteomiche condotte su campioni di osso murino hanno portato all'identificazione di componenti chiave del sistema del complemento (C3) quali attori dei meccanismi patogenetici dell'osteomielite, fornendo, quindi, un razionale per la nuova proposta di ricerca.



Questa si propone di studiare i processi della risposta immunitaria innata alle infezioni batteriche dell'osso con un focus specifico sul complemento. Tale obiettivo sarà perseguito implementando due linee di ricerca: *i)* sperimentazione animale in topi geneticamente modificati e *ii)* modelli tridimensionali di co-culture di cellule dell'osso ed SA su matrici ossee sintetiche. Ove possibile, ci si avvarrà di organoidi dell'osso in cui geni del complemento siano stati modificati ad-hoc.

Obiettivo generale di questo studio è identificare nuovi bersagli molecolari per strategie profilattiche, diagnostiche e terapeutiche innovative.