



BILANCIO SOCIALE

2020

FONDAZIONE BEPPE E NUCCY ANGIOLINI ONLUS
Sede legale: 20121 Milano - Via Agnello19
Codice Fiscale: 97795610159 - Codice Destinatario: SUBM70N
Registrata presso Prefettura di Milano N. 1594, pagina 6136,
volume 7°
Registrata Anagrafe Unica Onlus art. 10, C1, lett A, D.Lgs 460/1997, in data
7/11/2017 IBAN IntesaSanPaolo: IT98K 03069 096061 00000 154885
Patrimonio netto Euro 100.000,00 i.v.

Bilancio Sociale 2020

(predisposto ai sensi del decreto legislativo n. 117/2017)

Il Bilancio Sociale è lo strumento con il quale intendiamo rendere conto del nostro operato ai portatori di interesse, rendendo trasparenti e comprensibili all'interno e all'esterno dei progetti, le attività ed i risultati raggiunti nelle ricerche che abbiamo finanziato.

E' stato predisposto secondo le linee guida indicate nel Decreto 4 luglio 2019 "Adozione delle Linee guida per la redazione del bilancio sociale degli enti del Terzo Settore". Ha lo scopo di "offrire una informativa strutturata e puntuale a tutti i soggetti interessati non ottenibile a mezzo della sola informazione economica contenuta nel bilancio di esercizio".

Questo Bilancio Sociale, nel terzo anno della Fondazione, rappresenta il bilancio di un anno intero dei progetti in corso: il 2020.

La Fondazione Beppe e Nuccy Angiolini ONLUS

La Fondazione si è costituita in data 19 Ottobre 2017, con Atto Notaio Gianfranco Benetti, Notaio in Rozzano dai Signori Giuseppe Angiolini e Giuseppina Sala, denominata *Fondazione Beppe e Nuccy Angiolini ONLUS* e avente natura non lucrativa di utilità sociale, con sede in Milano in Via Agnello 19 ed è stata iscritta nel Registro delle persone Giuridiche della Prefettura di Milano al numero d'ordine 1594 della pagina 6136 del volume 7°.

In data 7 novembre 2017 è stata registrata nell'Anagrafe Unica Onlus, art. 10, C1, lettera A, D.Lgs. 460/1997.

In data 15 ottobre 2020 con Atto Notaio Roberto Bossi, Notaio in Milano sono state apportate alcune modifiche allo Statuto al fine di renderlo rispondente ai requisiti richiesti dalla nuova normativa in tema di Enti del Terzo Settore (ETS). Il nuovo Statuto sarà operativo dopo la creazione del Registro Unico Nazionale del terzo Settore (RUNTS) e la successiva iscrizione della Fondazione.

La Fondazione possiede i requisiti di legge per consentire la deducibilità delle erogazioni liberali ricevute dalle persone fisiche e dagli enti soggetti all'imposta sui redditi (IRES) per un ammontare pari al minore tra i due seguenti limiti: 10% del reddito imponibile ed Euro 70 mila (Art. 14 D.L. 35/2005 convertito con Legge n. 80 del 14/05/2005 e DPCM 12/10/2016). L'art. 1 c. 353 della L. 266/2005 e il DPCM 31/10/2015 consentono inoltre alle società e agli enti soggetti passivi IRES l'integrale deducibilità dal reddito dei fondi trasferiti a titolo di contributo o liberalità.

Missione e identità della Fondazione

Crediamo che ognuno di noi ha il dovere, secondo le proprie possibilità, di contribuire ad uno sviluppo solidale e armonico della collettività e degli uomini e delle donne che la compongono. Infatti questo è sancito all'art. 1 dello Statuto della Fondazione che precisa che *la Fondazione è Ente filantropico del terzo settore, non ha scopo di lucro, né diretto, né indiretto, non può distribuire utili, ed esercita in via esclusiva attività di interesse generale per l'esclusivo perseguimento di finalità civiche, solidaristiche e di utilità e solidarietà sociale*. Specifica inoltre che:

"Lo scopo della Fondazione è di interesse generale e cioè di sviluppare la ricerca scientifica, di particolare interesse sociale nel campo delle malattie infettive, dei meccanismi di resistenza e di patologia ad esse relati, principalmente la nicchia costituita dal tessuto osteo-muscolare.

Le attività istituzionali della Fondazione sono:

- *L'erogazione di denaro, beni e servizi a sostegno della beneficenza indiretta nel rispetto di quanto*

previsto all'art. 10 comma 2 bis del D. Lgs. 460/1997, indirizzata ad attività di ricerca.

- Il finanziamento dei progetti di ricerca.

La beneficenza indiretta e i finanziamenti dei progetti di ricerca saranno indirizzati e svolti principalmente, dalla Fondazione Humanitas per la Ricerca/Humanitas University o presso l'Istituto di Ricerche Farmacologiche Mario Negri.

La Fondazione ha il divieto di svolgere attività diverse da quelle istituzionali ad eccezione di quelle ad esse direttamente connesse perché secondarie e strumentali, quali ad esempio:

- a) promuovere ed organizzare incontri, workshop, convegni e pubblicazioni, iniziative ed eventi promozionali e tutte quelle iniziative idonee a favorire un organico contatto tra la Fondazione, le Istituzioni, il sistema di comunicazione e dei media, nazionale ed internazionale, e più in generale verso tutte le componenti della società;
- b) svolgere, con l'osservanza delle modalità di legge, attività di raccolta fondi e finanziamenti, e l'attività di raccolta pubblica di fondi, sia direttamente sia attraverso altri enti utilizzando gli strumenti più idonei per il sostegno delle proprie iniziative;
- c) partecipare ad associazioni, fondazioni ed enti ed istituzioni pubbliche e private, la cui attività sia rivolta, direttamente o indirettamente, al perseguimento di scopi analoghi a quelli della Fondazione medesima;
- d) stipulare ogni opportuno atto o contratto e convenzioni di qualsiasi genere con enti pubblici e privati, per il raggiungimento degli scopi della Fondazione.
- e) emettere borse di studio, nel rispetto delle disposizioni"

Gli Organi sociali della Fondazione

L'attuale Consiglio di Amministrazione della Fondazione è stato nominato alla data di costituzione della stessa e resta in carica a tempo indeterminato. Gli Organi Sociali della Fondazione alla data di approvazione del presente Bilancio sono:

Il Consiglio di Amministrazione, composto da:

Giuseppe Angiolini, Presidente

Alessandra Faraone, Vice Presidente

Giuseppina (Nuccy) Sala, Amministratore

Il Revisore Legale (in carica fino alla approvazione del Bilancio al 31 dicembre 2020:

Paolo Gullotta

Nessun compenso o rimborso spese per lo svolgimento dell'incarico è stato corrisposto al Consiglio di Amministrazione e al Revisore Legale.

Patrimonio della Fondazione

Il patrimonio della Fondazione è costituito:

- a) dai beni destinati dai Soci Fondatori in sede di atto costitutivo della Fondazione;
- b) da liberalità provenienti da altre fonti pubbliche e private, compresi i fondatori, con espressa destinazione ad incremento del patrimonio;
- c) dalla parte di rendite non utilizzata che, con delibera del Consiglio di Amministrazione, venga destinata ad incrementare il patrimonio;

d) dalle elargizioni fatte da enti o da privati e accettate dalla Fondazione con espressa destinazione a incremento del patrimonio.

Il Fondo di gestione della Fondazione è costituito:

- a) dalle rendite e dai proventi derivanti dal patrimonio e dalle attività della Fondazione medesima;
- b) da eventuali donazioni o disposizioni testamentarie, provenienti dai Fondatori o da terzi, che non siano destinate a patrimonio;
- c) dagli altri contributi attribuiti dallo Stato, da enti territoriali o da altri enti pubblici;
- d) dai ricavi delle attività connesse.

Dicono di noi

“Il valore di Fondazione Angiolini” va ben al di là dei numeri – sottolinea il **prof. Alberto Mantovani**, Direttore Scientifico di Humanitas, Presidente di Fondazione Humanitas per la Ricerca e docente di Humanitas University – È un segno di quanto sia importante e necessario farsi carico delle sfide cliniche (come l’osso) che costituiscono un problema per i nostri pazienti. Inoltre, catalizza uno sforzo collaborativo tra due grandi istituzioni come il Mario Negri e Humanitas: non dimentichiamo che sempre più il progresso della scienza medica dipende dal fare massa critica e avere sinergie significative. Quella di Fondazione Angiolini è una sinergia al servizio della ricerca e della salute”. Ad oggi, gli studi svolti sotto l’egida della Fondazione nel settore dell’immunologia dell’osso si sono cristallizzati in un intero fascicolo di *Frontiers Immunology* (Research Topic: Innate Immunity in the Context of Osteoimmunology - <https://www.frontiersin.org/research-topics/9648/innate-immunity-in-the-context-of-osteoimmunology>), a conferma della caratura internazionale del lavoro coordinato da Antonio Inforzato (Humanitas University) in collaborazione con Cristina Sobacchi (CNR) in un settore così importante. Inoltre, grazie al sostegno di Fondazione Angiolini è stato avviato con risultati promettenti un ulteriore progetto di ricerca su biomarcatori di infezioni batteriche, che rappresentano un serio problema nel contesto della chirurgia protesica. In Humanitas lo studio, portato avanti nella chirurgia dell’anca, si avvale dello scambio di competenze e della stretta collaborazione tra ricerca preclinica, coordinata da Barbara Bottazzi e clinica, coordinata da Guido Grappiolo”.

“Il mecenatismo di Beppe e Nuccy Angiolini ha due importanti finalità – spiega il **prof. Silvio Garattini**, direttore dell’Istituto di Ricerche Farmacologiche Mario Negri – Sostenere giovani ricercatori nel loro percorso di studio delle patologie dell’osso e della muscolatura e, contemporaneamente, rafforzare la collaborazione tra due qualificati Istituti di ricerca della Lombardia. In questo svolgendo una preziosa azione di sussidiarietà in un momento in cui lo Stato e le Istituzioni sembrano aver dimenticato il valore della ricerca. A loro va il più sincero ringraziamento del mio personale dell’intero Istituto di Ricerche Farmacologiche Mario Negri. Grazie alla generosità della Fondazione sono in corso ricerche che hanno permesso di reclutare dalla Danimarca la Dott.ssa Claudia Nastasi, una esperta in campo dell’immunologia dei tumori. La ricercatrice lavora con altri collaboratori per capire quali siano i rapporti fra le metastasi ossee provenienti da vari tipi di tumori, primariamente dal tumore della mammella e della prostata, e le risposte immunitarie. Queste risposte verranno seguite sia nella fase della disseminazione delle cellule tumorali a partire dal tumore primario, sia nella fase dell’impianto delle cellule a livello della matrice ossea. Queste ricerche verranno realizzate in associazione con studi riguardanti gli effetti antitumorali di farmaci citotossici e immunomodulanti al fine di trovare una ottimale sinergia fra chemioterapia e immunoterapia”.

“Conosco Beppe e Nuccy Angiolini da molti anni - ha commentato il **Cav. Ernesto Pellegrini** - e con mia moglie Ivana condividiamo con loro una stretta amicizia. Ho seguito la nascita della Sua Fondazione dall’inizio, quando sulla scia della costituzione della Fondazione Pellegrini mi partecipò la sua intenzione di costituire a sua volta una Fondazione indirizzata alla ricerca scientifica in campo medico. Beppe Angiolini è stato un punto di riferimento scrupoloso e puntuale del Consiglio di Amministrazione della Pellegrini per molti anni e sono sicuro che esprimerà nella Fondazione oltre ad una Sua vocazione filantropica un forte impegno al raggiungimento degli scopi della stessa. Bravissimi Beppe e Nuccy!”

“ Il valore della missione della Fondazione Beppe e Nuccy Angiolini Onlus– ha sottolineato il **Dott. Pierluigi Stefanini**, Presidente Gruppo Unipol e ASviS, Alleanza Italiana per lo Sviluppo Sostenibile – risulta immediato. Sostenere la ricerca in campo medico rappresenta una scelta lungimirante, piena di valore etico,

impregnata di sensibilità e vocazione altruistica. Il momento storico che stiamo vivendo richiede ogni sforzo per investire nella ricerca medica per individuare soluzioni capaci di alleviare, curare e sconfiggere cronicità invasive e micidiali per la salute delle persone. La collaborazione attiva ed intelligente con centri di eccellenza quali Humanitas e Mario Negri di Milano contiene una visione ed una sensibilità davvero encomiabili. Grazie al Dott. Angiolini e alla Signora Nuccy, con l'auspicio che questa strada di impegno pensato per il bene comune si rafforzi in uno spirito emulativo.”

“J'ai pu apprécier la droiture et le professionnalisme, tant de Beppe que de Nuccy, au cours des 30 dernières années – ha commentato **Jean Mouton**, Président du Conseil d'Administration di Nexans. Lorsqu'ils nous ont parlé, à Elena et moi, de leur projet de Fondation, nous avons de suite été séduits et rassurés sur le devenir de cette Institution, développée avec la même professionnalité que toutes les entreprises auxquelles ils ont pu participer au cours de leurs riches carrières. Nous y avons associé modestement quelques-uns de nos amis à un moment important de notre vie, et nous sommes aujourd'hui heureux d'avoir pris cette décision. Complimenti di nuovo!”

“La costituzione di una nuova Fondazione con scopi filantropici - sottolinea l' **Ing. Giuseppe Orsi**, AD della Fondazione Ernesto Pellegrini - è sempre motivo di grande gioia. In questi anni di condivisione delle difficoltà con i commensali del ristorante solidale Ruben e di approfondimento delle cause che le hanno determinate ci siamo resi conto quanto la salute sia un fattore determinante per la potenziale ripartenza delle persone passate in modo improvviso dal benessere all'indigenza. Sono certo che l'impegno della Fondazione Beppe e Nuccy Angiolini sarà un valore aggiunto importante anche per la rete che sostiene le persone in difficoltà: un altro mark nella Milano che si muove per la scienza e per chi ha bisogno.”

“Il grande valore della Fondazione Angiolini è sinergico con il quotidiano lavoro del Banco Alimentare – sottolinea il **Dott. Roberto Vitali**, Responsabile dei Progetti Speciali del Banco Alimentare per la Lombardia – la prima si occupa di salute e noi ci occupiamo di nutrire in modo sano e intelligente gli indigenti, entrambi abbiamo la medesima finalità: fare vivere meglio i bisognosi che vivono ai margini della società e ridurre i costi della sanità pubblica, con beneficio della intera collettività”.

“Da oltre 10 anni sono tesoriere di AHMIS, associazione che lavora all'interno dell'Ospedale Sacco di Milano -indica il **Dott. Ugo Lanza-**, gestendo l'Hospice del reparto Malattie Infettive. Non posso, quindi, che esternare il mio plauso per quanto la Fondazione Angiolini sta realizzando per la ricerca grazie alla concreta presenza di Humanitas sotto la guida del prof. Alberto Mantovani e dell'Istituto Mario Negri coordinato dal prof. Silvio Garattini. La ricerca è fondamentale per il miglioramento della qualità della vita dell'umanità”.

“La Fondazione Angiolini –Dice **Toti Faraone-** commercialista in Milano-, grazie alla cooperazione con Humanitas e Mario Negri rappresenta anche i valori fondanti del Rotary: amicizia, servizio, leadership, diversità ed integrità. Assieme a mia moglie Franca ci complimentiamo con Beppe e Nuccy Angiolini per il generoso contributo che donano alla società tramite l'opera della loro Fondazione”.

Attività del Consiglio di Amministrazione nel 2020

Nel corso dell'anno 2020, il Consiglio di Amministrazione si è riunito tre volte.

Nella prima riunione si è approvato il primo Bilancio della Fondazione al 31 Dicembre 2019 che ha visto entrate per euro 254.350 ed uscite per euro 242.189 di cui 240.000 per donazioni alle due fondazioni, l'istituto Farmacologico Mario Negri e la Fondazione Humanitas per la Ricerca.

Nel secondo Consiglio è stato presentato il resoconto semestrale del Progetto “*Ruolo della pentrassina lunga PTX3 nell'osteomielite*” in corso presso la Fondazione Humanitas per la Ricerca, e del Progetto “*Metastasi ossee: studio delle basi biologiche e sviluppo di nuove strategie terapeutiche*” in corso presso l'Istituto di Ricerche Farmacologiche Mario Negri IRCCS. Si è inoltre approvato il finanziamento di \$16.000 per la pubblicazione sulla rivista scientifica *Frontiers in Immunology*, (*Innate Immunity in the Context of Osteoimmunology* - <https://www.frontiersin.org/research-topics/9648/innate-immunity-in-the-context-of-osteoimmunology>) per una serie di otto articoli che saranno predisposti dalla Fondazione Humanitas e dall'Istituto Mario Negri.

Nel terzo Consiglio si è preso atto dello stato di avanzamento dei due progetti al termine del secondo

anno, presentati nei giorni precedenti in videoconferenza, presenti oltre ai partecipanti ai due progetti, il Prof. Silvio Garattini e il Prof. Alberto Mantovani. I progetti sono sinteticamente descritti nella sezione “I progetti finanziati dalla Fondazione ed in corso di esecuzione”. Si è quindi approvata la donazione di euro 120.000 alla Fondazione Humanitas per la Ricerca e di euro 120.000 all’Istituto Farmacologico Mario Negri per l’anno 2021.

Donazioni effettuate dalla Fondazione ai Progetti in corso nell’anno 2020

Le donazioni effettuate dalla Fondazione nel 2020 e relative al terzo anno di finanziamento dei due Progetti (2021) sono state complessivamente di euro 240.000, come segue:

- Fondazione Humanitas per la Ricerca, Rozzano Euro 120.000
- Istituto Farmacologico Mario Negri, Milano Euro 120.000

Inoltre, nel 2020 La Fondazione ha finanziato la pubblicazione sulla rivista *Frontiers in Immunology*, Research Topic 9648 di una serie di 8 articoli su “Innate Immunity in the Context of Osteoimmunology” per un costo di Euro 13.554.

Situazione Economica e Finanziaria al 31 Dicembre 2020

Per quanto riguarda il dato economico relativo al risultato della gestione 2020, a fronte di entrate per donazioni e altre entrate diverse per euro 257.659 si sono registrate spese per donazioni, pubblicazioni scientifiche, ammortamenti e oneri diversi per euro 253.593, con un risultato positivo della gestione per euro 39. Il patrimonio netto della Fondazione al 31 Dicembre 2020 è pari ad euro 115.539.

Di seguito sono riportati in maggior dettaglio i Rendiconti Gestionale, Patrimoniale e Finanziario meglio descritti nel Bilancio di Esercizio 2020

Sintesi rendiconto gestionale (dati in euro)	2020	2019
Donazioni Soci Fondatori	250.000	250.000
Altre donazioni	150	4.350
Proventi finanziari	7.506	28
Altri proventi	3	0
Totale proventi	257.659	254.378
Ammortamenti immobilizzazioni immateriali	-2.175	-2.175
Oneri bancari e finanziari	-1.698	-14
		0
Costi per Servizi	-72	28
Altri oneri e sopravvenienze	-121	0
Totale disponibilità generate nell’esercizio	253.593	252.189
Assegnazioni deliberate dagli organi istituzionali	-240.000	-240.000
Pubblicazioni scientifiche	-13.554	0
Avanzo di gestione del periodo	39	12.189

Sintesi rendiconto patrimoniale (dati in euro)	2020	2019
Immobilizzazioni Immateriali	4.787	6.962
nnn		
Immobilizzazioni Immateriali C		
Crediti	0	63
Disponibilità liquide	110.752	108.490
Totale attivo	115.539	115.515

Fondo di dotazione	100.000	100.000
Patrimonio libero	15.539	15.500
Patrimonio netto	115.539	115.500
Debiti entro 12 mesi	0	-15
Totale passivo	115.539	115.515

Sintesi Rendiconto finanziario (dati in euro)	2020	2019
Liquidità netta all'inizio del periodo	108.490	39.144
Entrate per donazioni Soci Fondatori	250.000	305.000
Entrate, altre donazioni		305.000
E		305.000
Entrate per altre donazioni	150	4.350
Altre entrate da attività finanziarie	6.144	28
Flusso di cassa generato nel periodo	256.294	309.378
Uscite per attività di interesse generale	240.000	240.000
Uscite per attività diverse	13.554	32
Uscite da attività finanziarie e di supporto generale	478	
Totale uscite nel periodo	254.032	240.032
Liquidità netta alla fine del periodo	110.752	108.490

I progetti finanziati dalla Fondazione ed in corso di esecuzione

Nel corso del 2020, in coerenza con quanto previsto dalle delibere approvate lo scorso anno e finanziate dalla Fondazione, sono iniziate le attività dei due Progetti e più specificatamente:

PROGETTO 1. Ruolo della pentrassina lunga PTX3 nell'osteomielite, sviluppato presso la Fondazione Humanitas per la Ricerca (FHR), assieme all'Istituto di Ricerca Genetica e Biomedica del Consiglio Nazionale delle Ricerche (CNR) presso l'Istituto Clinico Humanitas IRCCS (ICH).

Stato dell'arte e rationale dello studio. L'osteomielite è un'infezione ossea debilitante spesso causata dal

batterio *Staphylococcus aureus* (SA). Con l'aumentare del numero di ceppi batterici resistenti agli antibiotici e delle procedure chirurgiche per impianto e sostituzione di protesi articolari, nonché in considerazione dell'invecchiamento progressivo della popolazione, urgente è la domanda di nuovi approcci profilattici e terapeutici al trattamento di questa infezione. La pentrassina lunga PTX3 è un mediatore solubile dell'immunità innata che svolge ruoli essenziali nella protezione dell'ospite da microrganismi patogeni. Notevole è inoltre il suo potenziale quale biomarcatore diagnostico e prognostico nella sepsi, ivi comprese le infezioni da ceppi di SA meticillino resistenti (MRSA).

Ipotesi dello studio. Recentemente è stato dimostrato che il deficit genetico di PTX3 in animali sperimentali è associato ad una ridotta formazione della matrice ossea durante il rimodellamento fisiologico di questo tessuto e la sua rigenerazione dopo frattura; ciò suggerisce che PTX3 svolga un ruolo importante nel turn-over della matrice ossea. Sulla base di tali evidenze e delle funzioni che PTX3 esercita nelle infezioni opportunistiche e nella sepsi, si è ipotizzato che questa pentrassina sia coinvolta nell'eziopatogenesi dell'osteomielite.

Obiettivi generali e risultati attesi. Questo progetto di ricerca si propone di investigare il ruolo di PTX3, quale paradigma dell'immunità innata umorale all'interfaccia con la matrice ossea, nell'osteomielite da SA. E' atteso che questo studio generi nuove ipotesi meccanicistiche in osteoimmunologia e fornisca indicazioni originali su modalità innovative di trattamento dell'osteomielite.

Obiettivi specifici al secondo anno (Dicembre 2020). Gli obiettivi del secondo anno, conclusosi il 31 dicembre scorso, sono stati:

1. valutazione degli outcome primari (infezione) e secondari (morfometria, istologia, citologia e infiammazione) di un modello animale (murino) di infezione locale (nel femore) da SA (descritto nella Relazione annuale 2019) che ricapitola l'osteomielite da chirurgia e/o trauma nell'uomo e consente di

studiare il ruolo patogenetico di PTX3 *in vivo*;

2. ulteriore sviluppo di modelli sperimentali 3D *in vitro* che riproducano il microambiente dell'osso in condizioni di infezione da SA e consentano di apprezzare il ruolo di PTX3, quali strumenti di verifica e/o sviluppo di ipotesi meccanicistiche.

3. valutazione del potenziale di PTX3 quale biomarcatore per la diagnosi delle infezioni articolari periprotetichesche.

Piano sperimentale dello studio. Il perseguimento degli obiettivi progettuali precedentemente elencati ha

richiesto una pianificazione delle attività sperimentali su livelli multipli come di seguito dettagliato:

Piano sperimentale dell'obiettivo 1: infettare (per via intra-femorale) topi wild type (WT) e geneticamente modificati (PTX3 deficienti, o KO) con SA, e monitorare l'evoluzione della patologia scheletrica in termini di carica microbica, parametri sierologici, immunologici, osteologici e morfometrici.

Piano sperimentale dell'obiettivo 2: ottimizzare le condizioni di coltura di cellule MC3T3 (linea murina pre-osteoblastica) e SA su scaffold ossei biomimetici di nuova concezione, e definire protocolli di estrazione di mRNA da cellule MC3T3 adese allo scaffold con l'obiettivo di valutare l'espressione di geni di interesse nel corso dell'infezione.

Piano sperimentale dell'obiettivo 3: analisi dei dati generati nell'ambito di uno studio diagnostico coordinato dal dott. Mattia Loppini (Medico Assistente presso l'Unità di Ortopedia dell'Anca e Chirurgia Protetica di ICH) e dalla dott.ssa Barbara Bottazzi (Responsabile del Laboratorio di Immunofarmacologia di ICH) in cui sono stati arruolati soggetti con protesi d'anca o ginocchio e sospetta infezione periprotetica, sottoposti a chirurgia di revisione. In questi soggetti è stata misurata la concentrazione di PTX3 nel plasma e nel liquido sinoviale e ne è stata valutata l'associazione con la presenza di infezione ed il suo grado di severità.

Metodologia applicata. Le attività indicate sono state svolte applicando una strategia sperimentale interdisciplinare che combina tecniche e metodologie della microchirurgia, della microbiologia e dell'immunologia molecolare e cellulare, dell'imaging nel piccolo animale e della diagnostica clinica.

Obiettivo 1. Topi C57Bl/6 WT e PTX3 KO maschi di circa 8 settimane sono stati infettati mediante iniezione di SA nella cavità midollare del femore destro; in parallelo, secondo la stessa procedura un analogo gruppo di animali è stato inoculato con il solo veicolo (PBS), come controllo. Gli animali sono stati assegnati all'uno o all'altro gruppo di trattamento in modo random e monitorati allo scopo di rilevare l'insorgenza di eventuali segni di sofferenza, in particolare difficoltà nella deambulazione e zoppia. Sono stati effettuati prelievi dalla vena caudale al giorno dell'infezione e, successivamente, ogni 3/4 giorni per valutare l'andamento dei livelli circolanti di citochine infiammatorie (mediante tecniche ELISA). Al 16° giorno, gli animali sono stati sacrificati per il prelievo di sangue ed organi. Al sacrificio sono state prelevate le ossa degli arti inferiori al fine di misurarne la carica batterica mediante conta delle CFU (Colony Forming Units, ovvero numero di batteri vivi) ed effettuarne valutazioni istochimiche (su sezioni di tessuto). La carica batterica negli arti inferiori è stata, inoltre, valutata a tempi brevi (6° giorno dall'infezione), allo scopo di caratterizzare l'andamento locale dell'infezione. In ulteriori esperimenti, si è proceduto al prelievo del midollo osseo (al fine di determinarne la composizione cellulare mediante tecniche citofluorimetriche) ed alla preparazione del tessuto muscolo-scheletrico per analisi morfometriche (mediante tecniche microCT, micro computed tomography). Con l'obiettivo di valutare la disseminazione dell'infezione ad altri organi e tessuti sono state effettuate analisi citofluorimetriche della milza e microbiologiche del fegato.

Obiettivo 2. In riferimento alle attività sperimentali *in vitro*, cellule MC3T3 e batteri (SA) sono stati singolarmente incubati con scaffold biomimetici (prodotti presso l'Istituto di Scienza e Tecnologia dei Materiali Ceramici del CNR di Faenza) e ne sono state monitorate adesione e proliferazione mediante quantificazione del DNA genomico con tecnica Picogreen e conta dei batteri vivi (CFU), con l'obiettivo di ottimizzare le condizioni di coltura per successivi studi di infezione in modalità 3D sulle stesse matrici. Sono stati, inoltre, sviluppati protocolli di estrazione di mRNA da cellule MC3T3 adese allo scaffold allo

scopo di isolare mRNA in quantità e qualità sufficienti a valutare l'espressione di geni di interesse (possibilmente con approcci olistici del tipo RNA sequencing) nel corso dell'infezione.

Obiettivo 3. In relazione alle attività cliniche svolte nell'ambito del progetto, sono stati elaborati ed analizzati i dati generati in uno studio diagnostico dal titolo "Studio osservazionale monocentrico di accuratezza diagnostica della proteina pentrassina 3 ematica e sinoviale per la diagnosi di infezione periprotetica di anca e ginocchio". In questo studio sono stati arruolati 126 soggetti con protesi d'anca o ginocchio e sospetta infezione periprotetica, sottoposti a chirurgia di revisione parziale o totale. In questi soggetti è stata misurata la concentrazione della proteina PTX3 nel plasma e nel liquido sinoviale mediante tecnica ELISA. Ciò ha consentito di valutare la potenza diagnostica (in termini di sensibilità e specificità) di PTX3 quale marcatore di infezione e correlarne i livelli con virulenza del patogeno/grado di infezione, sia individualmente che in combinazione con marcatori in uso nella pratica clinica corrente (CRP, VES e d-dimero).

Considerazioni statistiche. I dati ottenuti sono stati analizzati usando test statistici non-parametrici allo scopo di valutare l'effetto del genotipo sull'infezione ossea nonché sui parametri sierologici ed immunologici misurati.

Conclusioni al termine del secondo anno. I risultati ottenuti in questa seconda fase dello studio, in combinazione e ad integrazione di quelli generati nel primo anno, indicano che *il deficit genetico di PTX3 protegge dall'infezione da SA* quando il patogeno è iniettato direttamente nella cavità midollare del femore di animali sperimentali (topi), condizione che mima l'osteomielite da chirurgia e/o trauma nell'uomo. In particolare, è stato osservato che gli animali PTX3 deficienti mostrano una notevole riduzione della carica batterica nell'arto infetto e presentano, in generale, sintomi di sofferenza più lievi rispetto agli animali WT. In linea con queste osservazioni, la risposta infiammatoria è più accentuata negli animali WT SA rispetto a quelli PTX3 KO SA, in termini di espansione del compartimento leucocitario (monociti/macrofagi e PMN) nella milza.

Inoltre, *l'effetto protettivo associato al deficit di PTX3 è evidente già a 6 giorni dall'infezione con SA.* Quest'ultima evidenza suggerisce che PTX3 svolga un ruolo importante nelle fasi iniziali dell'infezione, quando i meccanismi di adesione, formazione di biofilm ed ascessi messi in atto da SA svolgono un ruolo dominante. Questi processi saranno studiati e caratterizzati in futuri esperimenti *in vivo* ed *in vitro*. Inoltre, sono state ottimizzate le condizioni sperimentali per *i)* coltivare cellule MC3T3 ed SA su scaffold ossei biomimetici ed *ii)* estrarre mRNA da cellule MC3T3 adese allo scaffold in quantità e qualità adeguate ad analisi trascrittomiche. Questi aspetti procedurali costituiscono un prerequisito fondamentale per la futura implementazione di co-culture MC3T3/SA in setting 3D quali modello *in vitro* di OM.

Il dato più rilevante emerge dalla clinica, per cui *la proteina PTX3 nel liquido sinoviale si configura quale marcatore diagnostico ad elevata specificità di infezione periprotetica.* Sulla scia di queste evidenze, è stato elaborato un nuovo protocollo di studio che prevede di integrare i dati clinici e biochimici disponibili dalla stessa coorte di pazienti con informazioni di natura genetica. Questo studio, dal titolo "Identificazione di biomarcatori genetici della suscettibilità all'infezione periprotetica di anca e ginocchio e della severità di patologia", si propone di valutare l'associazione tra polimorfismi a singola base (SNPs) presenti nel gene PTX3 e l'incidenza di infezione periprotetica dell'anca e del ginocchio in pazienti sottoposti a chirurgia di revisione. Esso sarà coordinato dal dott. Loppini (quale responsabile clinico) e dal dott. Inforzato e dalla dott.ssa Sobacchi (quali responsabili scientifici). Si fa presente che il relativo protocollo ha già superato la fase di valutazione formale presso il Comitato Etico Indipendente di ICH, la cui valutazione di merito è attesa per Febbraio/Marzo 2021.

Pubblicazioni. Le pubblicazioni dei ricercatori del progetto, nel corso di questo anno sono state:

1. Stravalaci M, Davi F, Parente R, Gobbi M, Bottazzi B, Mantovani A, Day AJ, Clark SJ, Romano MR, Inforzato A. (2020) Control of Complement Activation by the Long Pentraxin PTX3: Implications in Age-Related Macular Degeneration. *Front Pharmacol.* 11:591908.
2. Parente R, Doni A, Bottazzi B, Garlanda C, Inforzato A. (2020) The complement system in *Aspergillus fumigatus* infections and its crosstalk with pentraxins. *FEBS Lett.* 594(16):2480-2501.
3. Magrini E, Di Marco S, Mapelli S, Perucchini C, Pasqualini F, Donato A, de la Luz Guevara Lopez M,

Carriero R, Ponzetta A, Colombo P, Cananzi F, Supino D, Reis ES, Peano C, Inforzato A, Jaillon S, Doni A, Lambris JD, Mantovani A, Garlanda C. (2020) Complement activation promoted by the lectin pathway mediates C3aRdependent sarcoma progression and immunosuppression. Nature Cancer [in press].

4. Doni A, Parente R, Laface I, Magrini E, Cunha C, Colombo F, Lacerda J, Campos Jr A, Petroni F, Porte R, Inforzato A, Bottazzi B, Garlanda C, Botto M, Carvalho A, Mantovani A. (2020) Serum Amyloid P component is an essential element of resistance against *Aspergillus fumigatus*. Nat Commun. [in revision].

Altre attività. Le ulteriori attività svolte sul progetto sono state:

Partecipazione a bandi competitivi di finanziamento. In considerazione dei dati incoraggianti prodotti nei primi due anni e dell'opportunità offerta dal bando PRIN (Progetti di ricerca di Rilevante Interesse Nazionale) 2020 del MUR (Ministero dell'Università e della Ricerca), una proposta di ricerca è stata redatta ed inviata al MUR per valutazione competitiva. Questa prevede un ventaglio di attività che spaziano da modellistica *in vitro* a

sperimentazione animale e studi clinici, ed è strutturata secondo un approccio metodologico e tecnologico di tipo integrato e transdisciplinare.

A tal proposito, è previsto lo sviluppo di nuove metodologie di microscopia ad alta risoluzione e sensibilità che consentiranno di valutare, in particolare, composizione e struttura delle diverse componenti della matrice ossea. lo studio proposto prevede il coinvolgimento di 5 unità (Dott.ssa Cristina Sobacchi, CNR; Dott. Antonio Inforzato, Humanitas University; Prof. Dario Polli, Politecnico di Milano; Prof. Tullio Scopigno, Università di Roma "La Sapienza"; Prof.ssa Antonella Mencacci, Università di Perugia).

Ulteriori attività scientifiche in collaborazione. Nell'alveo delle attività sperimentali in seno al progetto, è stata avviata una collaborazione con l'Istituto di Ricerche Farmacologiche "Mario Negri" di Milano che prevede la caratterizzazione cinetica delle interazioni tra PTX3 e componenti selezionate del sistema del complemento allo

scopo di fornire una cornice biochimica ad una delle ipotesi meccanicistiche circa il ruolo di PTX3 nell'osteomielite, ovvero la capacità di questa pentrassina di regolare l'attivazione del complemento, sistema chiave nella risposta immunitaria nativa alle infezioni.

PROGETTO 2. Metastasi ossee: studio delle basi biologiche e sviluppo di nuove strategie terapeutiche, sviluppato presso l'Istituto di Ricerche Farmacologiche Mario Negri IRCCS, nelle sedi di Milano e Bergamo.

Il microambiente tumorale (TME), nelle sue componenti cellulari e molecolari, ha un ruolo determinante nella malattia oncologica, e in particolare nello sviluppo delle metastasi. Questa considerazione ha aperto la strada allo sviluppo di diversi strumenti terapeutici per alterare o "rieducare" il microambiente tumorale, con il fine ultimo di ostacolare la crescita dei tumori e delle metastasi.

Nello specifico, l'interazione delle cellule tumorali con cellule e molecole presenti nell'osso guida ogni fase del processo di formazione delle metastasi ossee, regolando la migrazione delle cellule tumorali alla sede ossea, la sopravvivenza delle cellule tumorali stesse che sfuggono al sistema immunitario, la proliferazione della nuova lesione, e infine l'attivazione di cellule deputate al rimodellamento osseo per formare lesioni osteolitiche o osteoblastiche.

È da sottolineare come le metastasi ossee rappresentino un problema medico importante in quanto molti tumori maligni umani, alcuni dei quali molto frequenti come quelli della mammella e della prostata, metastatizzano frequentemente all'osso. La presenza di metastasi ossee riduce fortemente la sopravvivenza e la qualità della vita di questi pazienti anche perché le terapie disponibili per contrastarle sono poco efficaci. È quindi molto importante attuare della ricerca focalizzata allo studio delle metastasi ossee che ponga le basi per lo sviluppo di nuove strategie terapeutiche per le metastasi ossee.

Obiettivi generali del progetto.

Questo progetto si prefigge di studiare il microambiente (TME) della metastasi ossee per sviluppare nuovi approcci farmacologici che, agendo sul TME, possano inibire lo sviluppo e la progressione delle metastasi

all'osso.

Lo studio è stato suddiviso in due sottoprogetti:

- 1) modulazione farmacologica dei macrofagi del microambiente metastatico per l'acquisizione di un fenotipo antitumorale che inibisca l'attecchimento e la progressione tumorale metastatica.
- 2) analisi del ruolo della TSP-1 nello sviluppo di metastasi ossee osteolitiche e identificazione di specifici domini con potenziale attività antimetastatica come base per nuovi approcci terapeutici.

Sottoprogetto 1. Modulazione farmacologica dei macrofagi del microambiente metastatico per l'acquisizione di un fenotipo anti-tumorale che inibisca la progressione tumorale.

Stato dell'arte e razionale. Il sistema immunitario (SI) è composto da elementi cellulari e fattori che condizionano l'organismo umano sia in stato di salute che in malattia. Il SI si divide in due parti: una "immunità innata" (aspecifica ed immediata) ed un'altra "adattativa" (antigene specifica e di memoria) che, essendo

interconnesse, si supportano e regolano a vicenda. Ad oggi, la modulazione del sistema immunitario ad uso terapeutico è sempre più radicata in clinica oncologica con risultati incoraggianti.

In generale, l'immunità anti-tumorale comporta la cattura e l'elaborazione degli antigeni tumorali da parte delle

cellule presentanti l'antigene (APC) e la loro presentazione alle cellule T in modo da innescare la risposta adattativa; in seguito, i linfociti T migrano verso il tumore per esercitare specifici effetti antitumorali. Le APC giocano quindi un ruolo chiave nella risposta immunitaria e sono di due tipi: i macrofagi (MΦ) che sono residenti tissutali e che possono assumere fenotipo sia M1 (immunostimolante, anti-tumorale) che M2 (immunosoppressivo, tolerogenico), e le cellule dendritiche (DC) che hanno la capacità di migrare e indurre una risposta specifica esercitata dal sistema immunitario adattativo. I MΦ svolgono un ruolo essenziale per l'inizio e la progressione tumorale e metastatica condizionando quindi la prognosi della malattia; quelli associati al tumore sono denominati TAM e possono modificare il microambiente tumorale (TME) che, generalmente, promuove un fenotipo immunosoppressivo attraverso meccanismi molecolari e fattori che inibiscono l'attività delle cellule immunitarie. Ad oggi modulare il TME ed il fenotipo delle APC rappresenta un passo per lo sviluppo di un nuovo approccio per l'immunoterapia contro diverse tipologie tumorali e cancro.

Ipotesi dello studio. La nostra strategia d'azione punta alla rieducazione funzionale dei macrofagi MΦ e M2 del TME verso un profilo M1; tale switch sposterà l'equilibrio del TME che favorisce la crescita della massa metastatica risvegliando una risposta immunitaria antitumorale finalizzata ad una riduzione delle metastasi ossee.

A tal fine, è stata individuata una classe di farmaci agonisti dei recettori Toll-like receptors (TLRs) come possibili candidati. Questi recettori sono espressi dalle cellule target ma per evitare il loro effetto sui macrofagi di altri tessuti verranno generati, in collaborazione con il Politecnico di Milano, sistemi di delivery mirata evitando l'effetto sistemico indesiderato. Inoltre tali farmaci sono già stati approvati dalla Food and Drug Administration agency (FDA), che consentirebbe una più veloce applicabilità in clinica.

Obiettivi generali

- A. Studi *in vitro* su macrofagi murini ed umani isolati o generati da materiale murino e umano, per determinare l'efficienza dei trattamenti farmacologici mediante analisi molecolari e fenotipiche.
- B. In collaborazione con il Politecnico di Milano, generazione di nanoparticelle biocompatibili (NPs) che consentano la delivery selettiva dei farmaci all'osso per condizionare i macrofagi del TME. Allo stesso tempo, tale strategia verrà messa a confronto con costrutti di farmaci legati ai bifosfonati, i quali verranno sfruttati come agenti carrier dato il loro elevato tropismo osseo.
- C. Studi *in vivo* su modelli animali di metastasi ossee per analizzare l'attività dei farmaci immunomodulanti e validare la migliore strategia di delivery farmacologica.

- D. In collaborazione con il Politecnico, studi per la produzione di un modello simil-fisiologico di scaffold osseo mediante stampa 3D per analisi farmacologiche e di interazione cellulare.

Gli obiettivi raggiunti del primo anno

1. Messa a punto della metodica di isolamento e coltura di macrofagi (cellule primarie differenziate) isolate da materiale murino ed umano.
2. Attivazione della convenzione per la cessione di emocomponenti con l'ASST Rhodense per l'isolamento di precursori macrofagici ed altre popolazioni del sistema immunitario umano per studi *in vitro*
3. Studi su macrofagi *in vitro* la capacità immunomodulante dei farmaci presi in esame tramite analisi di espressione genica e di molecole di superficie.
4. Sviluppo di varie formulazioni di nanoparticelle cariche e di costrutti con i bifosfonati con conseguenti test di stabilità in media e plasma.

Sottoprogetto 2. Ruolo della TSP-1 nello sviluppo di metastasi ossee osteolitiche e identificazione di specifici domini con potenziale attività anti-metastatica come base per nuovi approcci terapeutici.

Stato dell'arte e razionale. Lo progetto è basato sulla nota capacità della trombospondina-1 (TSP-1) di organizzare il microambiente tumorale e coordinare la risposta delle cellule a variazioni delle proprietà del microambiente. Grazie alla sua struttura modulare, infatti, la TSP-1 lega un gran numero di molecole, compresi

fattori coinvolti nella formazione di metastasi e nel rimodellamento dell'osso. Sulla base di questa evidenza e del ruolo che la TSP-1 svolge nello sviluppo di metastasi ad altri organi, si è ipotizzato che questa proteina possa avere un ruolo nel regolare lo sviluppo di metastasi ossee osteolitiche.

Obiettivi specifici del secondo anno

Sulla base dei risultati ottenuti nel primo anno di studio, per il secondo anno ci siamo proposti di:

1. Definire il meccanismo di azione del frammento di TSP-1 attivo nell'inibire la formazione di metastasi osteolitiche, analizzando la sua attività a livello di cellule tumorali e di cellule del microambiente osseo
2. Identificare il dominio attivo all'interno del frammento.
3. Definire le proprietà del legame del frammento attivo a molecole implicate nella formazione delle metastasi ossee e nel rimodellamento della matrice ossea.

Approcci sperimentali

Obiettivo 1: valutare l'attività del frammento ricombinante su alcune funzioni delle cellule tumorali necessarie per il processo di formazione delle metastasi ossee (proliferazione, migrazione), e sul differenziamento e attività delle cellule deputate al rimodellamento dell'osso.

Obiettivo 2: produrre e analizzare frammenti ricombinanti a minore peso molecolare corrispondenti ai diversi domini funzionali presenti all'interno del frammento attivo della TSP-1.

Obiettivo 3: analizzare le proprietà di legame dei frammenti di TSP-1 a recettori e fattori solubili implicati nel differenziamento e attività delle cellule responsabili del rimodellamento dell'osso (saggi di legame su fase solida e mediante Risonanza Plasmonica di Superficie)

Conclusioni per il secondo anno della ricerca

L'attività di ricerca nel 2020 è stata inevitabilmente rallentata dall'emergenza sanitaria in corso. Tuttavia, sono stati fatti importanti progressi sia nello studio precedentemente avviato (sottoprogetto 2) che nell'acquisizione dei primi dati sull'effetto dei farmaci agonisti dei TLRs sulla polarizzazione dei macrofagi (sottoprogetto 1). Inoltre, sono stati messi a punto metodiche, modelli sperimentali e reagenti (compresi i domini ricombinanti della TSP-1, coniugati e nanoparticelle, e matrici sintetiche per modelli 3D) che saranno la base per gli studi nel prossimo anno per entrambi i sottoprogetti.

Sottoprogetto 1. I risultati ottenuti nei mesi di lavoro hanno delucidato quale dose degli agonisti dei TLRs è in grado di indurre lo switch di fenotipo nei macrofagi indifferenziati M0 e quelli M2 verso un fenotipo M1. La messa a punto del metodo ed il raggiungimento poi di questo risultato aprono la strada ai successivi e fondamentali steps per la sperimentazione di questo nuovo approccio farmacologico su modelli animali per le metastasi ossee. A questo scopo sono state formulate nanoparticelle in grado di incapsulare il farmaco e su cui sono in corso le dovute prove di stabilità e biocompatibilità prima dell'impiego *in vivo* su modelli di metastasi ossee.

Sottoprogetto 2. I risultati ottenuti quest'anno indicano due possibili meccanismi dell'azione antimetastatica del frammento attivo della TSP-1, che può agire sia sulle cellule tumorali che sulle cellule del microambiente osseo. In generale, i dati generati finora confermano le ipotesi originali dello studio, cioè la potenzialità di molecole basate su domini attivi della TSP-1 e di agenti che alterano il grado di polarizzazione dei macrofagi come strategie terapeutiche per agire sul microambiente per bloccare la progressione delle metastasi ossee.

Pubblicazioni

Carminati L, Taraboletti G. Thrombospondins in bone remodeling and metastatic bone disease. *Am J Physiol Cell Physiol.* 2020 Dec 1;319(6):C980-C990. doi: 10.1152/ajpcell.00383.2020.

Nastasi C, Mannarino L, D'Incalci M. - DNA Damage Response and Immune Defense. *International Journal of Molecular Sciences.* 2020; 21(20):7504, doi: 10.3390/ijms21207504

Presentazioni a congressi

Due abstract sono stati inviati a congressi per presentare i risultati ottenuti. Per la pandemia di COVID-19, i due congressi sono stati rimandati al 2021 e 2022.

Carminati L, Sangalli F, Borsotti P, Pinessi D, Broggin M, Taraboletti G. Investigating the role of thrombospondins in bone remodeling and metastasis. European Association for Cancer Research, EACR 2020, Torino (postponed to 09-12 June 2021)

Carminati L, Sangalli F, Borsotti P, Pinessi D, Broggin M, Taraboletti G. Modeling osteolytic bone metastasis to investigate the role of thrombospondins. Matrix Biology Europe 2020, Florence (*postponed to 2022*)

Approvazione, deposito e pubblicazione del bilancio sociale

Il presente bilancio sociale è stato approvato dal Consiglio di Amministrazione in data 31 marzo 2021 dopo l'esame da parte dell'organo di controllo che ne ha attestato la conformità alle linee guida indicate all'art. 8 del Decreto 4 luglio 2019. Esso è pubblicato anche sul sito www.fondazionebeppeenuccyangiolini.it

Relazione dell'Organo di Controllo

Il Bilancio Sociale 2020 della Fondazione Beppe e Nuccy Angiolini ONLUS, è stato esaminato dal revisore unico Dott. Paolo Gullotta secondo quanto indicato all'art. 8 del Decreto 4 luglio 2019 che ha attestato che "il Bilancio Sociale 2020 della Fondazione Beppe e Nuccy Angiolini ONLUS è stato redatto in conformità alle linee guida indicate all'art. 10 comma 3 del decreto legislativo n. 112/2017 e l'art. 30, comma 7 del codice del Terzo settore." Questo incarico è stato eseguito senza alcun compenso; si

ringrazia il Dott. Gullotta per l'impegno profuso nell'assistere la Fondazione.

Milano, 31 Marzo 2021



Il Presidente della
Fondazione Beppe e Nuccy Angiolini Onlus
Giuseppe Angiolini

fBeNA
FONDAZIONE
BEPPE e NUCCY ANGIOLINI

FONDAZIONE BEPPE E NUCCY ANGIOLINI ONLUS
Sede legale: 20121 Milano - Via Agnello19
Codice Fiscale: 97795610159 - Codice Destinatario:
SUBM70N Registrato Prefettura di Milano N. 1594, pagina
6136, volume 7°
Registrata Anagrafe Unica Onlus art. 10, C1, lett A, D.Lgs 460/1997, in
data 7/11/2017 IBAN IntesaSanPaolo: IT98K 03069 096061 00000 154885
Patrimonio netto Euro 100.000,00 i.v.