



**FONDAZIONE BEPPE E NUCCY
ANGIOLINI ETS**

**BILANCIO
SOCIALE
2023**

***A sostegno della ricerca delle malattie del
tessuto osteo-muscolare***

FONDAZIONE BEPPE E NUCCY ANGIOLINI ETS

Sede legale: 20121 Milano - Via Agnello 19

Iscritta nel Registro Unico Nazionale Terzo Settore Regione Lombardia – sezione “C – Enti Filantropici”

Codice Fiscale: 97795610159 - Codice Destinatario: SUBM70N

IBAN IntesaSanPaolo: IT98K 03069 096061 00000 154885

Fondo di Dotazione Euro 100.000,00 - Patrimonio Netto Euro 518.676,99

Lettera dei Fondatori



La Fondazione Beppe e Nuccy Angiolini muove i primi passi verso la fine del 2017 dalla nostra volontà di poter ritornare alla comunità parte del successo che abbiamo avuto dalla vita.

Occorreva pertanto una iniziativa che potesse rendere tutto questo possibile e a tal fine abbiamo ritenuto che il nostro finanziamento alla ricerca scientifica in ambito medico potesse essere la scelta più appropriata.

Decidemmo così di identificare Istituzioni in grado sviluppare questi progetti finanziandoli nei limiti delle nostre possibilità. Gli incontri con il Prof. Silvio Garattini e con il Prof. Alberto Mantovani, ci hanno fatto comprendere di avere scelto le Istituzioni più adeguate con le quali proseguire nei prossimi anni nei progetti.

Questi incontri ci hanno inoltre permesso di identificare una area della ricerca scientifica in cui ritenevamo di poter dare un contributo fattivo alla ricerca stessa.

Da parte mia, come moglie, che ho vissuto in questi anni le conseguenze di una infezione al tessuto osseo avuta da mio marito a seguito di un grave incidente con un mezzo agricolo di molti anni prima, ho subito condiviso questa iniziativa indirizzando la Fondazione ad investire specificatamente nelle ricerche nel settore

delle infezioni del tessuto osseo-muscolare. Vorrei che la Fondazione potesse dare un contributo alla comunità nell'affrontare alcuni aspetti legati alle esigenze di pazienti affetti da particolari tipologie ossee, come infezioni e metastasi, cercando in questo modo di favorire lo sviluppo di nuove idee e nuove risposte alla medicina attuale.

Così all'inizio del 2019 iniziammo con il finanziamento di due progetti triennali di ricerca presso la Fondazione Humanitas per la Ricerca e presso l'Istituto di Ricerche Farmacologiche Mario Negri.

Oggi, nel quinto anno della Fondazione, stiamo finanziando una estensione di questi progetti, con il progetto "Metastasi ossee: studio delle basi biologiche e sviluppo di nuove strategie terapeutiche" presso l'Istituto di Ricerche Farmacologiche Mario Negri e con il Progetto "Potenziale diagnostico e terapeutico della pentrassina lunga PTX3 nelle infezioni batteriche dell'osso" presso la Fondazione Humanitas per la Ricerca.

Quest'anno, inoltre, abbiamo donato alla Fondazione i mezzi finanziari per l'acquisto nel Comune di Vernate in frazione Pasturago di un terreno agricolo di circa 82.000 mq., attualmente a reddito con un contratto di affittanza agraria o per eventuali futuri sviluppi legati alla attività della Fondazione.

Siamo entrambi orgogliosi della decisione presa di creare questa Fondazione per il finanziamento alla ricerca scientifica in medicina e di avere avuto la possibilità di coinvolgere illustri scienziati e i loro team di ricerca, composti da persone giovani, determinate e di grande talento, certi di poter proseguire negli anni con queste iniziative ed estendere il nostro contributo a nuovi progetti.

Bilancio Sociale 2023

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 sesto anno della Fondazione, rappresenta il bilancio di un anno intero dei progetti in corso: il 2023.

La Fondazione Beppe e Nuccy Angiolini ETS

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).

In data 3 maggio 2022 è stato ottenuto il

Provvedimento di iscrizione di "FONDAZIONE BEPPE E NUCCY ANGIOLINI ETS" nella sezione "C – Enti filantropici" da parte dello Ufficio regionale del Registro unico nazionale del Terzo settore di Regione Lombardia.

In data 17 maggio 2022 e in data 7 settembre 2023 con Atti Notaio Roberto Bossi, Notaio in Milano sono state apportate alcune modifiche allo Statuto.

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 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:

- 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;

- 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;
- 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;
- stipulare ogni opportuno atto o contratto e convenzioni di qualsiasi genere con enti pubblici e privati, per il raggiungimento degli scopi della Fondazione;
- emettere borse di studio, nel rispetto delle disposizioni statutarie.

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:

- *Consiglio di Amministrazione* composto da Giuseppe Angiolini, Presidente; Alessandra Faraone, Vice Presidente; Giuseppina (Nuccy) Sala, Amministratore.
- *Revisore Legale*: Dott. Paolo Gullotta.

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 destinati a patrimonio;
- c. dagli altri contributi attribuiti dallo Stato, da enti territoriali o da altri enti pubblici;
- d. dai ricavi delle attività connesse.

Hanno detto della Fondazione negli anni



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". (feb/2021).

I risultati ottenuti hanno aperto la strada ad una nuova sperimentazione clinica che ha l'obiettivo di validare l'utilità clinica di un nuovo marcatore diagnostico messo a punto nei nostri laboratori". (feb/2022).

"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". (mar/2019).

"Ad oggi – riprende il **prof. Alberto Mantovani**, gli studi svolti sotto l'egida della Fondazione nel settore dell'immunologia dell'osso si sono cristallizzati in un intero fascicolo di *Frontiers Immunology: Innate Immunity in the Context of Osteoimmunology* - a conferma della caratura internazionale del lavoro



"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 mio più sincero ringraziamento e quello del personale dell'intero Istituto di Ricerche Farmacologiche Mario Negri. (feb/2019).

Sono attualmente in corso ricerche 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. Esse 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". (mar/2021)

Specifica il **Prof. Silvio Garattini**, l'osso è un sito di metastatizzazione che colpisce molti pazienti con cancro avanzato al seno (70%), prostata (85%), polmone (40%), rene (40%) e mieloma multiplo (95%). Le terapie attuali riducono le fratture associate alle metastasi ma mostrano effetti avversi, quindi,

sembra importante dover svilupparne nuovi o migliorare il delivery delle terapie attuali. Il primo obiettivo è quello di sviluppare nanotecnologie avanzate, in particolare nanoparticelle (organiche ed inorganiche, tollerate dal nostro organismo), che siano in grado di raggiungere in modo selettivo le metastasi ossee e rilasciare farmaci, sia quelli attualmente adoperati in clinica che altri di nostro interesse. Infatti, come secondo obiettivo ci si prefigge di verificare altre ipotesi terapeutiche: (i) dalla modulazione del microambiente tumorale osseo modificandone le proteine di matrice, (ii) alla valutazione dell'efficacia di un farmaco immunostimolante capace di risvegliare il sistema immunitario, educandolo a reagire contro le cellule tumorali ed a sviluppare una memoria protettiva.

"Questo progetto porta con sé numerose sfide, dal riconoscimento ed ottimizzazione della giusta formulazione di nanoparticelle da validare in vitro sino all'individuazione del giusto protocollo di somministrazione da testare in modelli animali. Per la multidisciplinarietà del progetto, quindi, si dovranno coinvolgere sia altri ricercatori del Mario Negri che figure esterne dell'Università Statale di Milano. Ciascuno contribuirà con le proprie competenze al raggiungimento di questo difficile obiettivo ma senza la generosità della Fondazione Beppe e Nuccy Angiolini non sarebbe possibile affrontare tale sfida." (feb/2022)



"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". (apr/2021)

Come sai apprezzo molto il lavoro fatto dalle Fondazioni benefiche, che portano avanti con forza e grande volontà progetti importanti e mi fa sempre molto piacere fare i complimenti a chi, come Te, riesce a raggiungere i propri nobili obiettivi, trovando in essi, il desiderio di guardare sempre avanti. Mi unisco quindi a Te nel rallegrarmi per quanto fino ad ora siete riusciti a fare e per quanto sono sicuro realizzerete in un prossimo futuro nel campo della ricerca medica. (set/2022).



“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.” (mar/2021)



“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 de 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!”. (apr/2021)



“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.” (gen/2021)



“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”. (feb/2021)



“Da molti anni sono Presidente di AHMIS, associazione che lavora all’interno dell’Ospedale Sacco di Milano - indica il **Dott. Ugo Lanza**-. 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". (gen/2021)



“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 per il generoso contributo che donano alla società tramite l'opera della loro Fondazione”. (apr/2021)



L'Amministrazione Comunale di Vernate nella persona del Sindaco Signora Carmen Manduca, a seguito di delibera di Giunta, ha conferito, l'11 settembre 2021 la civica benemerita “La Spiga

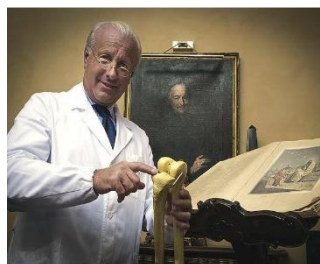
d'Oro” ai Fondatori con la seguente motivazione: “a Giuseppe Angiolini e Giuseppina Sala Angiolini per la finalità di indubbia utilità sociale della Onlus Beppe e Nuccy Angiolini della quale sono entrambi Soci fondatori, con particolare riferimento alla promozione dello sviluppo della ricerca scientifica nel campo delle malattie infettive, dei meccanismi di resistenza e di patologia ad esse correlati”. (set/2021)



“Sapere e volere guardare oltre al futuro anche lontano pur nella consapevolezza che probabilmente non ci apparterrà- ha sottolineato il **Dott. Fabio**

Cerchiai, Presidente di Atlantia-. Questo innanzi tutto significa guardare *più in là* della nostra sfera di personale interesse. Significa certo guardare alle persone con cui si condividono affetti, lavoro e vita quotidiana ma anche alla comunità intera. Ed è questo modo di essere e di agire, questo sentimento, questo autentico valore che caratterizza l'iniziativa con cui Beppe e Nuccy hanno dato vita alla Fondazione Angiolini. È, credo, in questa ottica e con questa prospettiva che vogliono svilupparne l'attività in campo medico al servizio della ricerca ed in favore

della salute collettiva. Non solo una scelta filantropica di grande valenza etica ma anche lungimirante e rispondente a bisogni concreti della collettività intera e di cui siamo quindi tutti potenziali beneficiari. Con questa sincera convinzione vi rinnovo quindi la mia ammirazione e la mia gratitudine per l'iniziativa intrapresa alla quale auguro un grande successo” (feb/2022)



Non trovo parole nell'esprimere il mio più vivo ringraziamento per avermi permesso di assistere allo incontro semestrale tra i ricercatori di Humanitas e

Mario Negri dei risultati delle ricerche, momento scientifico di grande rilievo, scrive il **Prof. Giorgio Calori**, Chirurgo ortopedico impegnato da almeno 30 anni nel settore delle infezioni e della rigenerazione dei tessuti in ortopedia. E' per me di grande interesse apprendere il risultato di nuove ricerche in tale ambito; naturalmente ogni innovazione scientifica deve tenere da conto delle conoscenze “vecchie” ed ormai consolidate, soprattutto in considerazione della naturale evoluzione del pensiero scientifico che non può né deve essere stravolto. A Voi, quindi, il merito ed il plauso per sostenere la ricerca, oltre modo promossa in un ambiente di così alta professionalità e competenza. Naturalmente l'augurio è che tutto ciò possa presto trovare applicazioni utili nella pratica clinica, per la cura dei nostri malati che resta pur sempre l'obiettivo primario. Mi farà piacere discutere con voi, le problematiche cliniche che incidono altrettanto significativamente sulla buona riuscita delle cure. (dic/2022).



Nella creazione della Fondazione Beppe e Nuccy Angiolini- ha scritto il **Dott. Girolamo Calsabianca**, Presidente Nazionale A.N.I.O.- riconosco un encomiabile impegno che merita la mia profonda stima e ricono-

scienza. La Fondazione ha realizzato un desiderio molto atteso dai malati e dai clinici dedicati da anni alla patologia. Volta ad affrontare le esigenze specifiche dei pazienti con patologie ossee, come le infezioni e le complicanze legate al sistema osseo e

muscolo-scheletrico, rappresenta un notevole contributo alla comunità scientifica, medica e alla cittadinanza. L'obiettivo di favorire lo sviluppo di nuove idee e risposte nella medicina attuale, in collaborazione con istituti di ricerca come la Fondazione Humanitas per la Ricerca e l'Istituto di Ricerche Farmacologiche Mario Negri, testimonia un approccio proattivo e costruttivo.

La Fondazione Beppe e Nuccy Angiolini si erige come catalizzatore di progresso e benessere per la comunità, dimostrando un tangibile senso sociale a cui ognuno di noi dovrebbe contribuire secondo le proprie possibilità. Questo nobile proposito emerge dal costante impegno nel restituire alla comunità qualcosa del successo che la vita vi ha donato.

Confido che la Fondazione diventerà un punto di riferimento autorevole nella comunità scientifica, restituendo concretamente ai cittadini i benefici della vostra dedizione.

Ringrazio per l'ispirazione offerta e per il vostro straordinario contributo, che reputo essenziale per il lavoro svolto da 25 anni dall' A.N.I.O. (Associazione Nazionale per le Infezioni Osteo articolari), da me fondata come strumento di supporto socio-assistenziale e sanitario per i malati di infezioni ossee e le loro famiglie.

La rete creata in questi anni ha sempre auspicato un supporto scientifico, e vederlo realizzato oggi è un grande conforto. La nascita della Fondazione nel 2017 coincide con la conclusione dei grandi lavori condotti da A.N.I.O. e il dicastero della salute, con il riconoscimento della patologia OSTEOMIELITE nei

LEA. Tale risultato ha ridato dignità al malato, ma per poter garantire le cure resta essenziale la ricerca, e grazie ai coniugi Angiolini anche questo viene portato avanti con eccellenti risultati.

Sono fiducioso che il team di collaborazioni coagulate dalla famiglia Angiolini scriverà un nuovo capitolo per questa patologia e oltre, nell'ambito socio-sanitario. (*gen/2024*).



Grazie al rinnovato e prezioso contributo di Fondazione Angiolini, - scrive il **Prof. Antonio Inforzato**, Head of Unit Cellular and Humoral Innate Immunity Lab e il **Prof. Alberto Mantovani**, ci aspettiamo, in particolare, di identificare nuove "firme" biochimiche e genetiche su cui costruire strumenti diagnostici e prognostici utili ai fini dell'identificazione precoce e della gestione tempestiva dei pazienti ad elevato rischio di infezione, con impatti positivi e di lungo termine sui costi sanitari e sociali delle infezioni ossee. La nostra ambizione è, da una parte, superare gli attuali limiti nella diagnosi clinica di infezione della protesi, dall'altra, individuare fattori genetici che predicano il rischio di infezione e consentano di attenzionare i pazienti che fanno impianto di protesi prima ancora di andare incontro a revisione. (*gen/2024*).

I progetti finanziati dalla Fondazione ed in corso di esecuzione

Nel corso dell'anno sono continuate le attività dei due Progetti e più specificatamente:

Progetto 1. Metastasi ossee: studio delle basi biologiche e sviluppo di nuove strategie terapeutiche.

Progetto 2. Potenziale diagnostico e terapeutico della pentrassina lunga PTX3 nelle infezioni batteriche dell'osso.

I ricercatori della Fondazione Humanitas per la

Ricerca e dell'Istituto di Ricerche Farmacologiche Mario Negri che nell'anno 2023 sono stati partecipi ai due progetti, e ai quali va un ringraziamento della Fondazione sono stati: Riccardo Becchetti, Patrizia Borsotti, Barbara Bottazzi, Enrico Cabri, Marta Cancelliere, Elena Carlessi, Laura Carminati, Francesca Davi, Tommaso Ceruti, Luisa de Cola, Maurizio D'Incalci, Andrea Doni, Paola Fabbrizio, Alessia Lucrezia Fenaroli, Roberta Frappoli, Maddalena Fratelli, Silvio Garattini, Valentina Granata, Chiara Grasselli, Raffaella Giavazzi, Antonio Inforzato, Roberto Leone, Francesca

Romana Liberati, Massimo Locati, Elisa Longhi, Mattia Loppini, Mirko Marabese, Cristina Matteo, Irene Mattiola, Alberto Mantovani, Claudia Nastasi, Valentina Possetti, Maria Sanchez, Fabio Sangalli, Benedetta Savino, Davide Scarpetta, Maria Cristina Schiavone, Matteo Stravalaci, Rita Silva-Gomez, Dario Strina, Cristina Sobacchi, Giulia Taraboletti, Sonia Valentino, Massimo Zucchetti.

Hanno partecipato inoltre, Alberto dal Corso e Mattia Mason dell'Università degli Studi di Milano, dipartimento di Chimica; Chiara Urbinati e Marco

Rusnati dell'Università degli Studi di Brescia, dipartimento di Medicina Molecolare e Transazionale; Iva Martin, Manuele Giuseppe Muraro e Andrea Mazzoleni dell'Università di Basilea, Dipartimento di Biomedicina; Monica Sandri e Elisabetta Campodori del CNR-ISTEC, Istituto di Scienza e Tecnologia dei Materiali Ceramici; Sebastien Jaillor, Giovanna Grieco e Silvia Carnevale di Humanitas University, laboratorio Innate Immunity in Inflammation and Cancer; Marie Astrid Boutet, Alessandra Nerivani e Costantino Pitzalis del Queen Mary University, London.

PROGETTO 1. 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.



Razionale e ipotesi dello studio

Le metastasi ossee, derivanti da diversi tipi di tumori primari – particolarmente carcinoma della mammella e della prostata – rappresentano un problema clinico importante. Lo sviluppo di metastasi ossee riduce la qualità della vita dei pazienti e la loro sopravvivenza. Attualmente sono poche le terapie disponibili in clinica, e il trattamento spesso è palliativo, mirato a ridurre o migliorare i sintomi causati dalla presenza di lesioni ossee. Pertanto, è di fondamentale importanza focalizzare la ricerca sullo studio dei meccanismi che guidano lo sviluppo di metastasi all'osso, al fine di individuare bersagli per nuove strategie terapeutiche. Il microambiente tumorale (TME) ricopre un ruolo fondamentale nel sostenere la progressione del tumore e lo sviluppo di metastasi. L'interazione delle cellule tumorali con le cellule residenti e le molecole presenti nel midollo osseo regola diversi aspetti dello sviluppo metastatico, quali la migrazione, la

sopravvivenza e la proliferazione delle cellule tumorali stesse, l'evasione del sistema immunitario e l'attivazione anomala delle cellule deputate al rimodellamento della matrice ossea, portando alla formazione di metastasi ossee osteolitiche o osteoblastiche. L'obiettivo finale di questo progetto è "rieducare" il microambiente tumorale dell'osso, al fine di renderlo meno favorevole alla crescita di metastasi. Nello specifico, ci occupiamo di due componenti chiave del microambiente tumorale: (i) i macrofagi, cellule dell'immunità innata che regolano la progressione tumorale con esiti opposti in base al loro grado di polarizzazione; (ii) la trombospondina-1, una molecola extracellulare nota per la sua attività pleiotropica nel regolare l'interazione tra il microambiente e le cellule tumorali.

Obiettivi del progetto

Lo scopo di questo progetto è studiare il microambiente (TME) delle metastasi ossee al fine di sviluppare nuovi approcci farmacologici che, agendo su sue componenti cellulari e/o molecolari, possano contrastare lo sviluppo di metastasi all'osso. Lo studio è suddiviso in due sottoprogetti:

- 1) Sviluppo di formulazioni nanotecnologiche per la modulazione dell'attività dei macrofagi presenti nel microambiente tumorale osseo, per l'acquisizione di un fenotipo immunostimolante che induca la risposta immunitaria adattativa specifica inibendo la progressione tumorale;
- 2) Analisi del ruolo della TSP-1 e suoi domini per sviluppo di metastasi ossee osteolitiche al fine di identificare specifici domini con potenziale attività anti-metastatica come base per nuovi approcci terapeutici

Sottoprogetto 1. modulazione farmacologica dei macrofagi nel microambiente metastatico dell'osso.

Stato dell'arte e razionale

I macrofagi sono cellule dell'immunità innata che giocano ruoli importanti nel mantenimento dell'omeostasi tissutale, proteggendo il nostro organismo tramite diversi meccanismi, quali fagocitosi e digestione di particelle estranee, patogeni e detriti cellulari. I macrofagi sono cellule "plastiche", in quanto responsive all'influenza del microambiente circostante, che ne può alterare l'espressione genica e le funzioni, orientandoli verso uno specifico fenotipo contesto-specifico. Nel microambiente tumorale, i macrofagi con fenotipo M1 promuovono una risposta immunitaria anti-tumorale, mentre i macrofagi M2 associati al tumore (TAMs) promuovono la progressione tumorale, stimolando i processi di angiogenesi, riparo tissutale, migrazione di cellule tumorali metastatiche, e tramite un'azione soppressiva dei linfociti T citotossici. Ad oggi, modulare il TME e il fenotipo dei macrofagi rappresenta una strategia per lo sviluppo di nuovi approcci immunoterapici contro diverse tipologie tumorali e metastasi. In questo contesto, il nostro scopo è quello di studiare e sviluppare nuove strategie per veicolare farmaci immunomodulanti verso il microambiente dell'osso, al fine di riprogrammare il fenotipo dei TAMs delle metastasi ossee.

Risultati e conclusioni

Nel corso dell'anno sono state sviluppate e studiate varie strategie di targeting mirato alle ossa per veicolare un farmaco immunomodulante. Nel corso dello scorso anno erano state sviluppate e migliorate le tecniche di sintesi ed incapsulamento dei liposomi, nanoparticelle di natura organica, per cui si è proseguito a funzionalizzare la loro superficie con molecole che potessero conferire affinità alle ossa. In collaborazione con il Dip. Di Chimica dell'Università di Milano, sono state percorse diverse strade che ci hanno poi condotto ad un colesterolo modificato per legarsi alle ossa. Infatti i liposomi classici (NBL) e quelli modificati (BBL) presentano parametri paragonabili in termini di: dimensione (144,1 vs 136,9 nm), z potenziale (-11,26 vs -19,75) e indice di polidispersione (0,074 vs 0,091), efficienza di carico (62,96 vs 45,30%) in $n=10$ esperimenti di sintesi indipendenti. La cinetica di rilascio *in vitro* ha inoltre dimostrato la similarità delle due formulazioni con la ritenzione del 70% del farmaco nelle prime 2h, seguito da un lento rilascio che continua fino le 24h

per gli NBL e che invece si interrompe prima per i BBL. Successivamente si è proceduto ad esporre cellule primarie macrofagiche ai liposomi funzionalizzati per caratterizzare la cinetica di internalizzazione, che ha un incremento esponenziale ed un picco massimo alle 48h; in parallelo, la caratterizzazione dei marcatori di superficie ha evidenziato come i macrofagi M0, esposti ai i BBL carichi di farmaco, subiscano uno shift del fenotipo e conseguente aumento di CD86, MHC-II (tipici degli M1) e riduzione del CD206 (tipico degli M2). L'analisi dell'espressione genica ha confermato l'attivazione trascrizionale dei macrofagi M0 e M2 ed incremento della trascrizione di geni M1 come *Nos2*, *Il12b* e *Il6*. Per dimostrare che l'effetto di switch fosse anche a livello proteico sono state analizzate e quantificate le citochine e chemochine secrete nel mezzo di coltura. Sia gli NBL che i BBL inducono la secrezione citochine pro-infiammatorie e di chemochine che sono responsabili del reclutamento di altre cellule del sistema immunitario, principalmente neutrofili e cell T. Questo risultato è in linea con l'obiettivo della delivery dell'immunostimolante in prossimità del TME metastatico osseo.

Successivamente, sia gli NBL che i BBL sono stati usati per un esperimento di farmacocinetica *in vivo*, somministrando endovena una dose equivalente di farmaco libero; gli animali sono stati sacrificati a diversi tempi e gli organi prelevati per la quantificazione del farmaco mediante spettrometria di massa. I dati hanno evidenziato che gli NBL sono migliori dei BBL aumentando la biodisponibilità del farmaco nei vari tessuti analizzati. A confronto con la somministrazione del farmaco libero, gli NBL aumentano il $t^{1/2}$ (il tempo al quale la concentrazione del farmaco si dimezza) per cui il farmaco resta per più tempo in circolazione. In particolare, il farmaco si distribuisce in tutti i tessuti, arriva alle ossa ed in questa sede permane fino le 6h post trattamento; di contro, il raggiungimento al midollo osseo è limitato evitando una stimolazione non necessaria della sorgente di cellule immunitarie e quindi reazioni sistemiche.

Di questa formulazione verranno settate le condizioni per uno scale-up delle sintesi per ottenere le dosi necessarie per condurre gli studi *in vivo* di attività antitumorale su modelli di tumore primario e metastatico.

Verrà inoltre implementato un sistema di organ-on-chip, chiamata MIVO, per eseguire delle farmacocinetiche *in vitro* in grado di aiutarci nei prossimi screening di selezione dei pro-drug.

Infatti, sempre in collaborazione con UniMi è in corso

di sviluppo la sintesi di coniugati bifosfonato-drug ed in parallelo verranno ingegnerizzati anticorpi coniugati al farmaco da indirizzare alle ossa.

In parallelo, in collaborazione con la prof.ssa De Cola, oltre a continuare a testare nanoparticelle inorganiche che possano essere utili al nostro scopo, cercheremo di ricoprire i liposomi con una corona di silice per aumentare ulteriormente la loro emivita e la disponibilità del farmaco in circolo.

Sottoprogetto 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.

Stato dell'arte e razionale

La trombospodina-1 (TSP-1) è una proteina della matrice extracellulare che svolge una funzione chiave nell'organizzare il microambiente tumorale e coordina l'interazione tra le cellule tumorali e le altre componenti del microambiente. La TSP-1 è caratterizzata da una struttura modulare, costituita da diversi domini, ognuno in grado di interagire con ligandi specifici, influenzando quindi diverse attività biologiche, in cellule tumorali e non. Nel microambiente, l'attività della TSP dipende dalla disponibilità dei suoi domini e dei rispettivi ligandi, e questo è in parte regolato da una proteolisi controllata della TSP-1 da parte di proteasi (contesto-specifiche) che liberano frammenti attivi della proteina.

Quando cellule tumorali migrano dal tumore primario e invadono altri tessuti (nel nostro caso l'osso) interagiscono con il microambiente, dando vita a fenomeni di regolazione reciproca delle diverse tipologie cellulari coinvolte. Le cellule tumorali possono proliferare e formare una massa metastatica, oppure rimanere dormienti anche per diversi anni e poi essere "risvegliate" da stimoli di molteplice natura. Nel microambiente osseo, cellule metastatiche "attive" interagiscono con le cellule residenti, fra cui quelle responsabili del processo fisiologico di rimodellamento osseo. Nelle metastasi ossee osteolitiche, focus del nostro progetto di ricerca, la presenza di cellule metastatiche porta a una iper-stimolazione della produzione e attività degli osteoclasti, con conseguente eccessiva degradazione della matrice ossea. Evidenze in letteratura dimostrano il coinvolgimento della TSP-1 nella regolazione sia della dormienza cellulare di cellule tumorali, sia del rimodellamento osseo. Questo progetto ha quindi lo scopo di studiare il ruolo della TSP-1 nelle metastasi ossee osteolitiche in

termini di: (i) effetto sull'osteoclastogenesi e degradazione della matrice ossea; (ii) rilascio di frammenti attivi della TSP-1 e (iii) regolazione della dormienza di cellule tumorali disseminate all'osso.

Risultati e conclusioni

i) Negli anni precedenti avevamo identificato un frammento della TSP-1 in grado di rallentare la comparsa delle metastasi ossee in un modello preclinico di carcinoma della mammella, proteggendo la matrice ossea dalla degradazione. Avevamo inoltre dimostrato che tale frammento riduce significativamente il processo di differenziamento degli osteoclasti (osteoclastogenesi) in vitro. Proseguendo su questa linea di ricerca, abbiamo approfondito l'analisi del meccanismo dell'azione di TSP-1 e del suo frammento attivo, analizzando le conseguenze funzionali del legame di TSP-1 e suo frammento a due molecole fondamentali per il differenziamento degli osteoclasti, RANKL e OPG, che svolgono un'azione opposta su questo processo. Nello specifico, abbiamo studiato la capacità di TSP-1 e del suo frammento di interferire con il legame di RANKL (il ligando fisiologico di RANK, che attiva il processo di differenziamento) al recettore RANK in sistemi cellulari e non. Inoltre abbiamo valutato come TSP-1 e il frammento interferiscono sulla cascata di segnali che, a seguito dell'attivazione del recettore RANK, portano al differenziamento e alla maturazione degli osteoclasti.

Abbiamo proseguito nello studio dell'interazione del frammento di TSP-1 con l'osteoprotegerina (OPG), inibitore fisiologico del legame RANK/RANKL e dell'osteoclastogenesi, per analizzare se il frammento alterasse l'azione inibitoria di OPG, e valutare l'impatto finale del frammento sul sistema complesso RANK/RANKL/OPG.

Infine, abbiamo prodotto, per via ricombinante, i singoli domini della proteina TSP-1 presenti nel frammento già studiato, e abbiamo analizzato la loro capacità sia di legare RANK che di inibire l'osteoclastogenesi. È emerso che nessun singolo dominio è in grado di inibire il differenziamento degli osteoclasti in misura significativa come il frammento intero. Questo dato, che riflette l'elevata complessità strutturale e funzionale della TSP-1, suggerisce l'esistenza di meccanismi intramolecolari/intermolecolari complessi nella regolazione del processo di osteoclastogenesi da parte della TSP-1.

ii) Un meccanismo fisiologico di regolazione dell'azione della TSP-1 è il rilascio di frammenti e

domini attivi a seguito di tagli proteolitici della molecola. La TSP-1 infatti viene fisiologicamente processata in sede extracellulare da diverse proteasi che liberano frammenti con funzioni biologiche specifiche. Per identificare i meccanismi che portano al rilascio del frammento attivo della TSP-1 nel microambiente osseo, è stata analizzata la capacità di diverse componenti cellulari presenti nel microambiente tumorale (sia cellule tumorali che cellule normali) di tagliare proteoliticamente la TSP-1 liberando frammenti attivi. I primi risultati indicano che mentre le cellule tumorali non sono in grado di degradare la TSP-1, cellule normali del midollo inducono il rilascio di un frammento con le stesse dimensioni del frammento attivo della TSP-1. Sono in corso studi per identificare gli enzimi proteolitici coinvolti.

iii) Infine abbiamo studiato se la TSP-1 fosse in grado di regolare la dormienza delle cellule tumorali nel microambiente osseo. In quest'ultimo anno abbiamo messo a punto un modello cellulare per studi in vitro e in vivo sulla dormienza delle cellule tumorali nel microambiente dell'osso. Le cellule tumorali sono state ingegnerizzate per esprimere una molecola fluorescente fusa a un marcatore della dormienza in modo che le cellule quiescenti possono essere visualizzate tramite il rilevamento di un segnale fluorescente. Questo modello, di cui abbiamo verificato la validità in vitro e vivo, è quindi uno strumento utile per lo studio dei processi cellulari e molecolari e del ruolo della TSP-1 nel controllo della dormienza tumorale nel microambiente osseo.

Pubblicazioni

Capitolo di libro per la serie «Interdisciplinary cancer research» - Springer Nature (curatore Prof. Nima Rezaei): C. Nastasi - "Advanced targeting systems for tissue-specific drug delivery"

M. Sancho-Albero, A.F. Fenaroli, C. Matteo, C. Grasselli, M. Zucchetti, R. Frapolli, C. Nastasi and L. De Cola – "Combining chemo- and immuno-therapy to improve cancer treatment, using two different responsive organosilica nanocarriers" (*manuscript to be submitted*).

Carminati L, Carlessi E, Longhi E, Taraboletti G. Controlled extracellular proteolysis of thrombospondins. *Matrix Biol.* 2023 Mar 30:S0945-053X(23)00048-3. doi: 10.1016/j.matbio.2023.03.011
 Longhi E, Carminati L, Carlessi E, Belotti D, Taraboletti G. Thrombospondin-1 in drug activity and tumor response to therapies. *Semin Cell Dev Biol.* 2023 Jul

4:S1084-9521(23)00136-2. doi: 10.1016/j.semcd.2023.06.009.

Presentazioni a congressi

R. Becchetti, C. Matteo T. Ceruti, R. Frapolli, M. Zucchetti, A. Dal Corso, and C. Nastasi - "Liposomes surface functionalization to target the bone matrix: a chemical challenge for a clinical purpose" Poster presentation, PhD meeting, 29-30 Giugno 2023, Milano

C. Matteo, R. Becchetti, T. Ceruti, R. Frapolli, M. Zucchetti, A. Dal Corso, and C. Nastasi "Liposomes surface functionalization to target the bone matrix: a chemical challenge for a clinical purpose". Poster presentation, EACR-AACR-IACR 2024 Conference: How to Bring Basic Science Discoveries to the Clinic, Dublino, 27-29 Febbraio.

C. Matteo, R. Becchetti, M. Cancelliere, M. Meroni, T. Ceruti, M. Zucchetti, R. Frapolli, A. Dal Corso, and C. Nastasi – "Targeting the bone matrix with liposomes to trigger the tumor microenvironment". Poster presentation, The Tumour Ecosystem: Cellular Interactions and Therapeutic Opportunities, Bergamo, 19-21 Marzo 2024.

Carminati L., Borsotti P., Longhi E., Urbinati C. 2, Sangalli F., Rusnati M., Taraboletti G. "Role of thrombospondin-1 in the microenvironment of osteolytic bone metastases" Poster presentation, Cold Spring Harbor Laboratory Meeting: Biology of cancer: microenvironment and metastasis, 19-23 Settembre 2023, Cold Spring Harbor

Carlessi E., Colombo M., Sangalli F., Marabese M. and Taraboletti G. Role of thrombospondin-1 in a model of breast cancer dormancy. "Role of thrombospondin-1 in a model of breast cancer dormancy" Poster presentation, PhD meeting, 29-30 Giugno 2023, Milano

Carlessi E., Carminati L., Borsotti P., Colombo M., Grasselli C., Ripamonti M., Sangalli F., Marabese M., Taraboletti G. "Role of thrombospondin-1 in a model of breast cancer dormancy" Poster presentation, The Tumour Ecosystem: Cellular Interactions and Therapeutic Opportunities, Bergamo, 19-21 Marzo 2024.

Carminati L., Borsotti P., Longhi E., Urbinati C., Sangalli F., Rusnati M., Taraboletti G. "Role of thrombospondin-1 in the microenvironment of osteolytic bone metastases". Poster presentation, The Tumour Ecosystem: Cellular Interactions and Therapeutic Opportunities, Bergamo, 19-21 Marzo 2024.

PROGETTO 2. Potenziale diagnostico e terapeutico della pentrassina lunga PTX3 nelle infezioni batteriche dell'osso, sviluppato presso la Fondazione Humanitas per la Ricerca ETS, in collaborazione con l'Istituto di Ricerca Genetica e Biomedica del Consiglio Nazionale delle Ricerche (IRGB-CNR) presso l'Istituto Clinico Humanitas IRCCS (ICH).



A. Executive summary

1. L'osteomielite (OM) è una grave infezione del tessuto muscoloscheletrico spesso associata ad eventi traumatici e chirurgia artroplastica (con particolare riferimento all'impianto di protesi dell'anca e del ginocchio).

2. Obiettivo generale delle ricerche in corso presso FHR è lo studio dei meccanismi patogenetici dell'OM, con un focus specifico sulla proteina PTX3 quale paradigma molecolare dell'interfaccia tra sistema immunitario e microambiente osseo.

3. Le evidenze generate nel triennio 2019-2021 indicano che PTX3 è coinvolta nella patogenesi delle infezioni batteriche dell'osso. In particolare:

- *in un modello murino di osteomielite da Staphylococcus aureus (SA, principale agente eziologico nella patologia umana), il deficit genetico (in animali geneticamente modificati) ed il blocco farmacologico (mediante un anticorpo monoclonale) di PTX3 sono associati ad una patologia meno grave;*

- *la concentrazione della proteina nel liquido sinoviale è un marcatore specifico di infezione nei pazienti sottoposti a revisione di protesi dell'anca o del ginocchio (di particolare rilevanza clinica per la gestione dei pazienti con sospetta infezione della protesi, PJI).*

4. Sulla base di queste evidenze, nel 2023 abbiamo condotto ulteriori ricerche volte a:

- *caratterizzare i meccanismi molecolari di PTX3 nella patogenesi dell'OM;*

- *sviluppare modelli 2D e 3D che ricapitolino struttura e microambiente della nicchia muscoloscheletrica allo scopo di valutare il ruolo di*

PTX3 nel turn-over fisiologico e patologico dell'osso;

- identificare "firme" genetiche e biochimiche di PJI che consentano di superare i limiti degli attuali protocolli diagnostici ed ottimizzare la gestione clinica dei pazienti a rischio di infezione.

B. Obiettivi del progetto

Stato dell'arte e razionale dello studio.

L'osteomielite è un'infezione ossea debilitante spesso sostenuta dal batterio *Staphylococcus aureus* (SA). Con l'espandersi dei fenomeni di antibiotico-resistenza e l'aumentare del numero delle procedure chirurgiche per impianto e sostituzione di protesi articolari, nonché in considerazione dell'invecchiamento della popolazione (principale fattore di rischio di fragilità osteoarticolare), la domanda di nuovi approcci diagnostici, prognostici e terapeutici al trattamento dell'osteomielite ha assunto carattere di urgenza. La pentrassina lunga PTX3 è una proteina dell'immunità innata che svolge ruoli importanti nella protezione da microrganismi patogeni ed è riconosciuta quale potenziale biomarcatore diagnostico e prognostico in molteplici infezioni, ivi comprese quelle sostenute da ceppi di SA meticillino-resistenti (MRSA).

Ipotesi. In studi precedenti abbiamo dimostrato che il deficit genetico di PTX3 in animali sperimentali è associato a ridotta formazione della matrice ossea durante il rimodellamento fisiologico dell'osso e la sua rigenerazione dopo frattura, il che suggerisce un ruolo importante per questa pentrassina nel turn-over del tessuto muscoloscheletrico. Sulla base di questo razionale e delle evidenze cliniche e precliniche prodotte nel triennio 2019-2021 (si veda la relazione scientifica dell'anno 2021), ipotizziamo che PTX3 sia coinvolta nella patogenesi dell'osteomielite batterica.

Obiettivi generali e risultati attesi. Il progetto di ricerca che insiste sul triennio 2022-2024 si propone di investigare i meccanismi molecolari di PTX3 nelle infezioni dell'osso quale base per lo sviluppo di nuove strategie di profilassi e terapia dell'osteomielite batterica, nonché validare (ed ampliare) il potenziale di questa pentrassina lunga

nella diagnosi di PJI. È atteso che questo studio generi nuove ipotesi meccanicistiche in osteoimmunologia e fornisca indicazioni originali su modalità innovative di gestione dei pazienti a rischio di osteomielite o con diagnosi di infezione.

Obiettivi specifici per l'anno 2023:

1. valutare la specificità del ruolo di PTX3 nella patogenesi dell'OM mediante l'impiego di animali privi di questa proteina e la ricostituzione della stessa con una sua forma ricombinante (prodotta in laboratorio), nonché l'identificazione delle popolazioni cellulari che la producono nell'infezione sperimentale;
2. investigare il ruolo di PTX3 nel rimodellamento fisiologico e patologico (in condizioni infiammatorie) del tessuto osseo avvalendosi di modelli 2D e 3D basati su co-culture di osteoblasti ed osteoclasti (isolati da topo e da uomo) in regime statico ovvero in perfusione;
3. finalizzare il reclutamento di pazienti nel nuovo protocollo di studio che ha, come obiettivo principale, l'identificazione di marcatori genetici della suscettibilità a PJI e della severità di patologia (si veda la relazione scientifica dell'anno 2022).

Piano sperimentale dell'obiettivo 1:

infettare con SA (10^5 CFU/topo), per via intra-femorale, topi geneticamente modificati (PTX3 deficienti, o *Ptx3*^{-/-}) cui viene somministrata per via intraperitoneale una formulazione ricombinante della proteina (50 mg/topo ogni 2 giorni a partire dal giorno successivo all'infezione) e monitorare l'evoluzione della patologia scheletrica a 6 giorni dall'infezione in termini di carica microbica nell'osso e ricostituzione della proteina PTX3 nel circolo sanguigno e nel tessuto muscoloscheletrico. Isolare cellule del midollo e dell'osso dal femore di topi WT (che producono PTX3) e *Ptx3*^{-/-} (che ne sono privi) infettati con SA a 14 giorni dall'infezione e valutare la produzione di PTX3 nelle rispettive sottopopolazioni cellulari mediante tecniche di citofluorimetria a flusso (FACS).

Piano sperimentale dell'obiettivo 2:

allestire co-culture 2D di osteoblasti primari (OBs) isolati dalla calvaria (cranio) di topi WT e *Ptx3*^{-/-} ed osteoclasti (OCs) derivati dal midollo di topi WT, allo scopo di valutare l'effetto del deficit genetico di PTX3 sul metabolismo osseo (produzione di collagene, capacità di mineralizzazione, espressione di geni associati all'osteogenesi, rapporto RANKL/OPG, potenziale osteoclastogenico) in condizioni fisiologiche ed infiammatorie (riprodotte *in vitro* mediante stimolazione delle cellule con TNF- α). Allestire co-culture 3D di osteoblasti ed osteoclasti umani su supporti bio-stampati che ricapitolano

composizione ed architettura della matrice ossea (prodotti presso l'Istituto di Scienza, Tecnologia e Sostenibilità per lo Sviluppo dei Materiali Ceramici, ISSMC, del CNR di Faenza) in bioreattori a perfusione che riproducono le condizioni fluidodinamiche del microcircolo del tessuto muscoloscheletrico (prodotti presso Celtec Biotek AG di Basilea).

Piano sperimentale dell'obiettivo 3:

finalizzare il reclutamento dei pazienti nel nuovo protocollo di studio clinico di tipo retrospettivo che, basandosi sulla coorte osservata nello studio precedente (coordinato dal dott. Mattia Loppini, Medico Assistente presso l'Unità di Ortopedia dell'Anca e Chirurgia Protesica di ICH, e dalla dott.ssa Bottazzi, Capo Unità presso il Laboratorio di Immunità Innata Umoreale e Cellulare di ICH), si propone di integrare i dati clinici e biochimici già disponibili con informazioni di natura genetica (da DNA genomico) allo scopo di identificare marcatori genetici della suscettibilità a PJI.

C. Metodologia applicata

Le attività proposte sono state svolte applicando una strategia sperimentale interdisciplinare che combina tecniche e metodologie della microchirurgia, della microbiologia, dell'immunologia molecolare e cellulare e della diagnostica clinica.

Obiettivo 1

Topi C57Bl/6 *Ptx3*^{-/-} maschi di circa 8 settimane sono stati infettati mediante iniezione di SA (10^5 CFU/topo) nella cavità midollare del femore destro, secondo la procedura operativa descritta nell'Allegato 1 alla relazione scientifica dell'anno 2019, adattata da studi precedenti. È stata, quindi, somministrata per via intraperitoneale una formulazione ricombinante di PTX3 murina prodotta e validata (per studi *in vitro* ed *in vivo*) nel nostro Laboratorio (50 mg/topo in 50 mL di PBS ogni 2 giorni a partire dal giorno successivo all'infezione. Alcuni topi (controllo) hanno ricevuto un pari volume di PBS (veicolo) secondo lo stesso schema di somministrazione. Gli animali sono stati assegnati ai gruppi di trattamento e di controllo in modo casuale e monitorati per rilevare l'insorgenza di eventuali segni di sofferenza, in particolare difficoltà nella deambulazione e zoppia. Sono stati effettuati prelievi di sangue dalla vena caudale al giorno dell'infezione e, successivamente, ogni 2 giorni per misurare i livelli di PTX3 nel siero (mediante tecnica ELISA). Al 6° giorno dall'infezione, gli animali sono stati sacrificati (tramite inalazione di CO₂) e ne sono stati prelevati organi e sangue. In particolare, sono state esaminate le ossa degli arti inferiori al fine di misurare la carica batterica locale mediante conta

delle CFU (Colony Forming Units, ovvero numero di batteri vivi) e determinare la concentrazione di PTX3 (con tecnica ELISA).

In altri esperimenti, Topi C57Bl/6 WT maschi di pari età sono stati infettati e monitorati come sopra descritto. Questi sono stati sacrificati al 14° giorno dall'infezione e ne sono state prelevate le cellule del midollo e dell'osso mediante una procedura che combina trattamenti meccanici (flushing) ed enzimatici (collagenasi). Le cellule così recuperate sono state analizzate mediante citofluorimetria a flusso (FACS) allo scopo di identificare le popolazioni cellulari che producono PTX3 nel corso dell'infezione sperimentale, mediante l'impiego di un anticorpo policlonale che riconosce selettivamente la proteina PTX3 del topo.

Obiettivo 2

Mono- e co-culture 2D di OBs ed OCs isolati da Topi C57Bl/6 *Ptx3*^{-/-} e WT sono state predisposte ed analizzate secondo i protocolli descritti in una nostra recente pubblicazione, cui si fa rimando per i dettagli sperimentali.

L'allestimento del modello 3D in perfusione ha richiesto una collaborazione specifica del nostro gruppo di ricerca con l'ISSMC del CNR di Faenza (che ha curato la stampa 3D e la caratterizzazione chimico-fisica di matrici biocompatibili ad elevata porosità e resistenza meccanica) e Celtec Biotek AG di Basilea (che ha condiviso la tecnologia U-CUP). A questo proposito, la dott.sa Valentina Possetti ha trascorso un periodo di studio e ricerca di 7 mesi presso i laboratori della Celtec, quale attività di formazione del proprio programma di Dottorato (finanziato dal Ministero dell'Istruzione, dell'Università e della Ricerca nell'ambito del Programma Operativo Nazionale, PON, e del Piano Nazionale di Ripresa e Resilienza, PNRR). Nel dettaglio, matrici semisintetiche, prodotte mediante stampa 3D con l'impiego di bioinchiostri contenenti derivati del collagene ed idrossiapatite, sono state utilizzate per allestire co-culture di OBs ed OCs umani derivati, rispettivamente, da cellule mesenchimali del midollo osseo e da monociti del sangue periferico, in bio-reattori U-CUP progettati e realizzati per colture cellulari 3D in condizioni fluido-dinamiche. Il protocollo adottato per questi esperimenti ha previsto la semina delle cellule mesenchimali (2 milioni/bioreattore) ed una fase iniziale di proliferazione cellulare (6 giorni in presenza del fattore di crescita FGF2) cui ha fatto seguito un trattamento osteogenico di 20 giorni mediante aggiunta al terreno di coltura di fattori osteoinduttivi, quali desametasone, acido ascorbico e glicerolo-b-fosfato. Al 26° giorno di coltura, sono stati quindi seminati monociti (2 milioni/bioreattore di cellule CD14⁺ isolate da sangue umano periferico) quali precursori di OCs e

si è passati a condizioni colturali osteoclastogeniche (vitamine D3 e prostaglandina E2 per 10 giorni). Differenziamento e maturazione di OBs ed OCs sono stati valutati mediante tecniche immunoenzimatiche ed immunostochimiche nonché sulla base dei livelli di espressione di geni distintivi delle due popolazioni cellulari. È stato inoltre possibile apprezzare localizzazione (adesione allo scaffold) e funzione (deposizione di nuova matrice ossea) delle cellule combinando metodologie di microtomografia computerizzata (microCT) e microscopia elettronica a scansione (SEM). Le co-culture OBs/OCs così allestite sono state infine trattate con un anticorpo monoclonale che riconosce e blocca specificamente PTX3 (MNB1) ovvero con formulazioni ricombinanti della proteina murina in condizioni fisiologiche ed infiammatorie (in presenza di TNF-α) allo scopo di valutare il ruolo di questa molecola nel turn-over osseo in un modello che riproduce i processi di generazione e accrescimento del tessuto osseo operanti *in vivo*.

Obiettivo 3

In relazione alle attività cliniche svolte nell'ambito del progetto, 93 soggetti sono stati arruolati nello studio clinico retrospettivo dal titolo "Identificazione di biomarcatori genetici della suscettibilità all'infezione periprotetica di anca e ginocchio (PJI) e della severità di patologia". I soggetti che hanno aderito a questo protocollo (e che derivano da una coorte storica di uno studio precedente) hanno donato campioni di saliva da cui è stato estratto DNA genomico allo scopo di caratterizzare polimorfismi comuni (con una frequenza dell'allele minore, MAF, > 5%) nel gene *PTX3* ed in altri geni selezionati sulla base delle evidenze disponibili dalla letteratura scientifica (*IL-1b*, *IL-10*, *IL-6* ed *IL-17A*). I livelli di *IL-1b*, *IL-10*, *IL-6*, CRP ed *a-defensina-1* sono stati dosati nei campioni di liquido sinoviale e (nel caso di *IL-10*) plasma disponibili dallo studio precedenti (mediante kit ELISA commerciali) e sottoposti ad analisi iniziali di correlazione.

Considerazioni statistiche

I dati ottenuti sono stati analizzati usando test statistici non-parametrici (Mann-Whitney, One-ovvero Two-way ANOVA, a seconda del numero di variabili e dei rispettivi livelli). Ove non espressamente indicato nelle figure e nelle corrispondenti didascalie, le differenze tra i gruppi sperimentali sono da intendersi non statisticamente significative.

D. Prodotti della ricerca

Risultati

Nell'ambito delle attività sperimentali condotte nel 2023 e relative all'**Obiettivo 1**, particolare attenzione è stata dedicata alla valutazione della specificità del ruolo di PTX3 nella patogenesi dell'OM da SA. A tal riguardo, infatti, il nostro gruppo di ricerca ha in precedenza dimostrato che PTX3 svolge un ruolo chiave nel turn-over fisiologico del tessuto osseo e che il suo deficit genetico si accompagna ad una ridotta formazione di osso trabecolare. Questo fenotipo è accentuato nei processi di rimodellamento acuto della matrice ossea (per esempio, in seguito a frattura) con particolare riferimento alla sua mineralizzazione. È quindi importante verificare che la riduzione della carica batterica osservata nell'arto infetto dei topi *Ptx3^{-/-}* (si veda la relazione scientifica dell'annualità 2022) sia dovuta all'assenza della proteina anziché al deficit di matrice ad essa associato. A tal proposito, topi *Ptx3^{-/-}* infettati con SA hanno ricevuto per via intraperitoneale una formulazione ricombinante di PTX3 murina (ovvero, PBS come controllo). Sono stati, quindi, effettuati prelievi di sangue e si è proceduto a misurare la carica batterica nell'arto infetto e la concentrazione della proteina esogena nell'omogenato di osso e nel siero. Dal peritoneo la proteina ricombinante diffonde al circolo sanguigno e si accumula nel siero a concentrazioni paragonabili a quelle osservate in animali WT sottoposti allo stesso protocollo di infezione. Inoltre, parte della proteina permea il tessuto muscoloscheletrico e si ritrova nell'omogenato osseo ad una concentrazione media di circa 7,3 pg/mg di proteine totali. È interessante notare come la carica batterica nell'arto infetto dei topi *Ptx3^{-/-}* aumenti quando questi vengono trattati con la proteina ricombinante, ad indicare che PTX3 svolge un ruolo specifico ed indipendente nell'infezione sperimentale da SA.

La comprensione dei meccanismi molecolari di PTX3 nella patogenesi dell'OM batterica necessita della conoscenza delle sorgenti cellulari della proteina nel corso dell'infezione. A questo proposito, abbiamo condotto nuovi esperimenti in cui le cellule del midollo e dell'osso sono state isolate dall'arto inoculato con SA di topi WT al 6° giorno dall'infezione ed analizzate mediante FACS avvalendosi di un pannello di anticorpi diretti contro marcatori specifici di sottopopolazioni cellulari delle linee mieloide, linfoide, osteoblastica ed osteoclastica. Le cellule così isolate sono state, inoltre, incubate con un anticorpo specifico per PTX3 murina previa permeabilizzazione della membrana cellulare con un detergente allo scopo di rilevare la proteina che viene sintetizzata nella cellula ed ivi si accumula prima di essere secreta. Relativamente al comparto ematopoietico (cellule CD45⁺), l'infezione determina un'espansione (aumento percentuale) selettiva dei macrofagi che producono PTX3 (Ptx3⁺) senza alterare la percentuale di neutrofili e monociti Ptx3⁺. La percentuale di cellule linfoidi (linfociti B e T) Ptx3⁺ non cambia in questo modello sperimentale (dati non mostrati). Inoltre, con riferimento alle cellule non-ematopoietiche (CD45⁻) che esprimono PTX3, soltanto la componente Sca-1⁺ (corrispondente ad una sottopopolazione di cellule staminali pluripotenti dell'osso) va incontro ad espansione nel corso dell'infezione.

Questi dati suggeriscono che la proteina PTX3 sia prodotta da almeno due distinte sottopopolazioni di cellule (macrofagi e cellule staminali dell'osso) quando i topi WT sono infettati con SA, e sono coerenti con quanto da noi stessi osservato in studi precedenti in cui abbiamo documentato l'espressione di PTX3 in cellule progenitrici di osteoblasti in condizioni di infiammazione sterile (frattura sperimentale e l'accumulo di cellule mieloidi nel midollo di topi (sia WT che *Ptx3^{-/-}*) nel corso dell'infezione sperimentale da SA (si veda la relazione scientifica dell'annualità 2021).

In riferimento alle attività sperimentali *in vitro* relative all'**Obiettivo 2**, sono state allestite mono- e co-culture 2D di OBs primari isolati dalla calvaria di topi WT e *Ptx3^{-/-}* ed osteoclasti (OCs) derivati dal midollo di topi WT, allo scopo di valutare l'effetto del deficit genetico di PTX3 sul metabolismo osseo in condizioni fisiologiche ed infiammatorie (riprodotte *in vitro* mediante stimolazione delle cellule con TNF- α). In sintesi (si veda la Figura 1), in condizioni omeostatiche, PTX3, sintetizzata da OBs maturi e loro precursori (1), inibisce la produzione di RANKL (2) e stimola il rilascio di OPG (3). La conseguente riduzione del rapporto RANKL/OPG (4) nonché l'aumento dell'espressione di CD44 da parte degli OBs (5) determinano l'inibizione

dell'osteoclastogenesi. Condizioni infiammatorie (trattamento con TNF- α) stimolano l'ulteriore produzione di PTX3 da parte degli OBs (6) e la proteina da questi secreta favorisce, attraverso la matrice extracellulare (7), la sintesi e la deposizione di collagene (8). In questo modo, PTX3 controbilancia gli effetti osteoclastogenici del TNF- α sugli OCs (9). Inoltre, questa proteina è coinvolta nella risposta infiammatoria degli OBs, modulandone l'espressione di chemochine, quali CCL2 e CCL3, coinvolte nella comunicazione con il sistema immunitario (10). Sulla base di queste evidenze (per i cui dettagli si rimanda alla nostra recente pubblicazione [12]), ipotizziamo che PTX3 eserciti un effetto osteogenico netto sul sistema OB/OC attraverso il contenimento dell'osteoclastogenesi in condizioni omeostatiche e la promozione della deposizione di matrice ossea in contesti infiammatori.

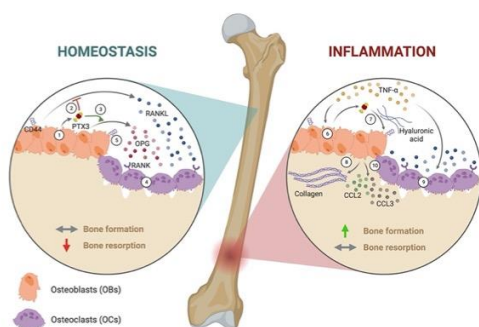


Figura 1. Rappresentazione schematica dei meccanismi attraverso i quali PTX3 partecipa al rimodellamento del tessuto osseo in condizioni omeostatiche ed infiammatorie sulla base di esperimenti 2D con mono- e co-culture di OBs ed OCs murini.

Con l'obiettivo di estendere queste indagini alla nicchia osteoblastica/osteoclastica umana, in collaborazione con l'ISSMC del CNR di Faenza e la Cellec Biotek AG di Basilea, abbiamo sviluppato co-culture 3D di osteoblasti ed osteoclasti umani basate su matrici bio-stampate e bioreattori in perfusione, secondo lo schema mostrato in Fig. 2.

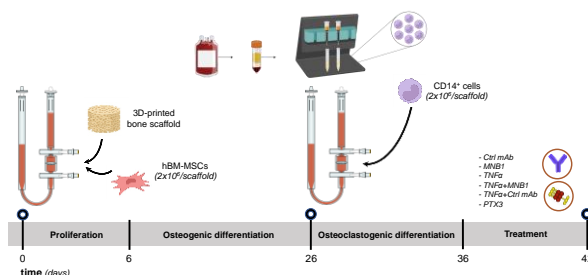


Figura 2. Disegno sperimentale dello studio di ricostituzione

della nicchia osteoblastica/osteoclastica umana in matrici 3D bio-stampate e condizioni di perfusione.

Il protocollo sperimentale messo a punto nello studio prevede la semina di 2 milioni di cellule mesenchimali da midollo osseo umano. A 6 giorni di coltura in un terreno contenente un fattore di crescita che stimola la proliferazione cellulare (FGF2) hanno fatto seguito 3 settimane di differenziamento osteogenico in presenza di un terreno osteoinduttivo che induce, appunto, il differenziamento delle cellule mesenchimali ad osteoblasti, ovvero le cellule specializzate nella sintesi delle componenti organiche ed inorganiche della matrice ossea. Successivamente, sono stati seminati monociti CD14⁺ purificati da sangue periferico umano i quali sono stati mantenuti in coltura per 10 giorni in presenza di stimoli specifici per il differenziamento ad osteoclasti, le cellule deputate al riassorbimento della matrice ossea. Al termine degli esperimenti, è stata effettuata una caratterizzazione morfologica e funzionale del modello mediante microtomografia computerizzata (microCT), microscopia elettronica a scansione (SEM), tecniche di immunofluorescenza ed istochimica ed analisi di espressione genica. Le co-culture OBs/OCs così ottenute sono state infine trattate con un anticorpo monoclonale che riconosce e blocca PTX3 (MNB1) ovvero con formulazioni ricombinanti della proteina murina in condizioni fisiologiche ed infiammatorie (in presenza di TNF- α) allo scopo di valutare il ruolo di questa pentrossina nel turn-over osseo.

Le analisi istologiche (colorazione con ematossilina ed eosina) e morfometriche (microCT) dimostrano che le matrici bio-printate (composte da derivati di collagene e microcristalli di idrossiapatite) sono state efficacemente colonizzate dalle cellule seminate e che queste hanno depositato nuova matrice extracellulare parzialmente mineralizzata. Inoltre, la microscopia SEM ha consentito di apprezzare la formazione di fibre di collagene e la caratteristica morfologia con filopodi e lamellipodi di OBs maturi. Mediante tecniche immunoenzimatiche (che consentono di rilevare l'attività dell'enzima TRAP, espresso da OCs), è stato infine possibile identificare OCs funzionalmente competenti.

Questi dati dimostrano che nelle condizioni sperimentali adoperate (co-culture 3D in bioreattori a perfusione), le cellule mesenchimali ed i monociti differenziano rispettivamente ad OBs e OCs, di fatto indicando la ricostituzione *in vitro* di aspetti salienti del microambiente osseo umano. Sono in corso analisi volte all'ulteriore caratterizzazione del modello ed alla comprensione del ruolo di PTX3 nel turnover fisiologico ed infiammatorio della matrice

ossea.

In relazione alle attività cliniche svolte nell'ambito dell'**Obiettivo 3** del progetto, nel Dicembre 2023 è terminata la campagna di arruolamento nello studio clinico finalizzato a definire il potenziale genetico (oltre che biochimico) di PTX3 nella diagnosi di PJI (dal titolo "Identificazione di biomarcatori genetici della suscettibilità all'infezione periprotetica di anca e ginocchio e della severità di patologia").

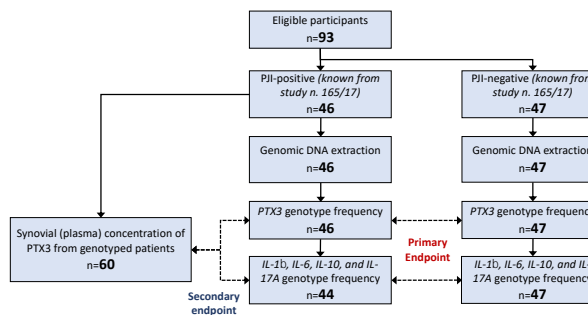


Figura 3. Disegno sperimentale dello studio clinico "Identificazione di biomarcatori genetici della suscettibilità all'infezione periprotetica di anca e ginocchio e della severità di patologia". È indicato il numero dei pazienti arruolati e di quelli da cui sono stati ottenuti dati genetici o per cui è disponibile la concentrazione della proteina PTX3 nel liquido sinoviale.

In tale studio sono stati arruolati 93 soggetti (derivanti dalla coorte storica del nostro precedente studio dai cui campioni di saliva è stato estratto DNA genomico successivamente impiegato per la genotipizzazione di polimorfismi nel gene *PTX3* ed in altri geni noti dalla letteratura essere coinvolti nella patogenesi dell'osteomielite batterica e nell'espressione di *PTX3* [2], tra cui le interleuchine IL-1 α , IL-6, IL-10 e IL-17A. Di questi 93 soggetti, 46 hanno ricevuto diagnosi di PJI e 47 sono stati classificati come asettici. I dati genetici ottenuti da questi pazienti saranno analizzati per studiare la relazione tra i polimorfismi selezionati ed il rischio di infezione (*primary endpoint*). Inoltre, per 60 soggetti è disponibile la concentrazione della proteina *PTX3* nel liquido sinoviale, la cui relazione con i dati genetici prodotti nello studio sarà oggetto di ulteriori analisi (*secondary endpoint in figura 3*).

Nell'ambito di queste indagini, abbiamo avuto la possibilità di dosare marcatori dell'infiammazione (IL-1 α , IL-6, IL-10, CRP ed α -defensina-1, in aggiunta a *PTX3*) in campioni di liquido sinoviale disponibili dallo studio precedente. In tutti i casi, come atteso, l'infezione causa un aumento significativo dei livelli delle proteine, con l'eccezione di IL-6 ed α -defensina-1, per cui si osserva in ogni caso una tendenza all'aumento (ancorché non significativa).

Conclusioni all'anno 2023

Obiettivo 1. I risultati ottenuti in questa fase dello studio, in combinazione e ad integrazione di quelli generati nei precedenti quattro anni, indicano che, nel modello animale di OM da SA, *la proteina PTX3 viene principalmente prodotta da macrofagi e cellule staminali pluripotenti dell'osso e svolge un ruolo patogenetico indipendente dal suo coinvolgimento nel turn-over della matrice ossea*. Queste evidenze corroborano ulteriormente l'ipotesi (maturata sulla base degli studi pregressi) che la pentrassina lunga *PTX3* sia coinvolta direttamente nei meccanismi patogenetici delle infezioni muscoloscheletriche sostenute da SA e suggeriscono che cellule ematopoietiche e non-ematopoietiche contribuiscono (attraverso la sintesi ed il rilascio di *PTX3*) a questi meccanismi.

Obiettivo 2. Sulla base di studi condotti su mono- e co-culture 2D di cellule dell'osso murino, proponiamo che *PTX3 eserciti un effetto osteogenico netto sul sistema OB/OC attraverso il contenimento dell'osteoclastogenesi in condizioni omeostatiche e la promozione della deposizione di matrice ossea in contesti infiammatori*. Con l'obiettivo di estendere queste indagini alla fisiopatologia umana, *abbiamo sviluppato un modello 3D basato su matrici ossee bio-stampate e bioreattori in perfusione che riproduce struttura, composizione e fluido-dinamica della nicchia osteoblastica/osteoclastica dell'uomo*.

Obiettivo 3. *Abbiamo terminato la campagna di arruolamento nello studio clinico finalizzato a definire il potenziale genetico (oltre che biochimico) di PTX3 nella diagnosi di PJI (dal titolo "Identificazione di biomarcatori genetici della suscettibilità all'infezione periprotetica di anca e ginocchio e della severità di patologia")*. È in corso l'analisi dei dati generati nello studio allo scopo di investigare le relazioni tra variabilità genetica, livelli di mediatori dell'infiammazione e rischio di patologia.

Pubblicazioni scientifiche

1. Lee SK, Inforzato A, Sobacchi C (2023) Editorial: Regulation of osteoclast differentiation in autoimmune and inflammatory diseases. *Front Immunol.* [doi: 10.3389/fimmu.2022.1125763]
2. Loppini M, Di Maio M, Avigni R, Leone R, Inforzato A, Grappiolo G, Mantovani A, Bottazzi B (2023) Long Pentraxin 3 as a New Biomarker for Diagnosis of Hip and Knee Periprosthetic

Joint Infections. J Clin Med. 12(3):1055 [doi: 10.3390/jcm12031055]

3. Porte R, Silva-Gomes R, Theroude C, Parente R, Asgari F, Sironi M, Pasqualini F, Valentino S, Asselta R, Recordati C, Monari MN, Doni A, Inforzato A, Rodriguez-Gallego C, Obando I, Colino E, Bottazzi B, Mantovani A (2023) Regulation of inflammation and protection against invasive pneumococcal infection by the long pentraxin PTX3. eLife 12:e78601 [doi: 10.7554/eLife.78601]
4. Massimino AM, Colella FE, Bottazzi B, Inforzato A (2023) Structural insights into the biological functions of the long pentraxin PTX3. Front. Immunol. 14:1274634 [doi: 10.3389/fimmu.2023.1274634]
5. Granata V, Strina D, Schiavone ML, Bottazzi B, Mantovani A, Inforzato A*, Sobacchi C (2023) Genetic Deficiency of the Long Pentraxin 3 Affects Osteogenesis and Osteoclastogenesis in Homeostatic and Inflammatory Conditions. Int. J. Mol. Sci. 24:16648. [doi: 10.3390/ijms242316648]

Altre attività

Partecipazione a congressi.

1. Association for Molecular Pathology (AMP) 2023 Europe Congress – June 18-20, 2023 - Milan, Italy [Poster Communication]
2. 18th International Conference on Innate Immunity – May 31-June 5, 2023 - Chania, Crete, Greece [Poster Communication]
3. 41st Annual Meeting of the European Bone and Joint Infection Society (EBJIS) – October 12-14, 2023 – Basel, Switzerland [Selected Abstract for Oral Communication].

Donazioni effettuate dalla Fondazione ai Progetti in corso nell'anno 2023

Le donazioni effettuate dalla Fondazione nel 2023 e relative al terzo anno del secondo triennio di finanziamento dei due Progetti, sviluppati nel periodo 2022-2024, sono state complessivamente di euro 240.000 come segue:



Fondazione Humanitas per la Ricerca ETS € 120.000



Istituto di Ricerche Farmacologiche Mario Negri € 120.000

Compensi ad Amministratori e all'Organo di Controllo

Nessun emolumento, compenso o corrispettivo è stato attribuito ai componenti dell'Organo di amministrazione. Come previsto dallo statuto, i componenti dell'Organo direttivo ricoprono il loro ruolo a titolo gratuito e spetta solo l'eventuale rimborso delle spese di viaggio.

L'Organo di controllo, monocratico, istituito ai sensi dell'art. 30 del D.Lgs. 117/2017, è nominato dal Presidente dell'Ordine dei Dottori Commercialisti e degli Esperti Contabili di Milano, tra le persone iscritte nell'apposito Registro dei Revisori Legali con l'osservanza degli artt. 2397 e 2399 del codice civile.

Contributi del 5 per mille

In ottemperanza all'art. 16 comma 5 del DPCM 23/07/2020, all'art. 1 comma 125 della Legge 4/8/2017 n°124 e all'art. 8 del D. Lgs. 3/7/2017 n°111, la Fondazione Beppe e Nuccy Angiolini ETS comunica che ha incassato il giorno 12/12/2023 contributi del 5 per mille relativi allo anno 2022 per € 1.308,10 dal Ministero del Lavoro e delle Politiche Sociali.

Bilancio di Esercizio al 31 Dicembre 2023

Per quanto riguarda il dato economico relativo al risultato della gestione 2023, a fronte di entrate per donazioni e altre entrate diverse per euro 647.097 si sono registrate uscite per donazioni, acquisto terreno agricolo, ammortamenti e oneri diversi per euro 642.696 con un risultato positivo della gestione per euro 4.401.

Il patrimonio netto della Fondazione al 31 Dicembre 2023 è pari ad euro 518.677.

Di seguito sono riportati il Rendiconto Patrimoniale e Gestionale, oltre alla Relazione dell'Organo di Controllo al Bilancio Sociale e al Bilancio di Esercizio.

Approvazione, deposito e pubblicazione del bilancio sociale e del Bilancio di Esercizio al 31 dicembre 2023

Il Bilancio Sociale e il Bilancio di Esercizio 2023 della Fondazione Beppe e Nuccy Angiolini ETS sono stati redatti in conformità alle "Linee guida per la redazione del bilancio sociale degli enti del Terzo settore",

adottate con il Decreto 4 luglio 2019 dal Ministero del Lavoro e delle Politiche Sociali ed approvate dal Consiglio di Amministrazione.

Il Consiglio di Amministrazione propone di destinare l'utile di gestione pari a Euro 4.401,36 ad incremento, per il medesimo importo, del Patrimonio libero derivante dagli avanzi dagli esercizi precedenti e pari a € 18.087,43.

Il Bilancio Sociale e il Bilancio di Esercizio sono pubblicati sul sito **www.fondazionebeppeenuccyangiolini.it**

Milano, 25 Febbraio 2024



*Giuseppe Angiolini, Presidente
Fondazione Beppe e Nuccy Angiolini ETS*

STATO PATRIMONIALE al 31 DICEMBRE 2023

(Schema decreto ministeriale n. 39 del 5 marzo 2020: Mod. A)

ATTIVO			PASSIVO		
	2023	2022		2023	2022
A) Quote associative	-	-	A) Patrimonio Netto	518.677	118.087
			I. Fondo di dotazione:		
			1. Fondo patrimoniale	70.000	70.000
			2. Fondo di garanzia	30.000	30.000
B) Immobilizzazioni	508.560	71.108	II. Patrimonio vincolato:		
I. Immobilizzazioni immateriali			2. Dagli amministratori	396.188	-
1. Spese di costituzione	-	1.836	III. Patrimonio libero:		
7. Altri oneri pluriennali	848	1.672	1. Avanzi di gestione	18.088	16.890
II. Immobilizzazioni materiali			IV. Avanzo di esercizio	4.401	1.197
1. Terreni agricoli	396.188	-			
III. Immobilizzazioni finanziarie					
3. Altri titoli: titoli di Stato	111.523	67.600			
C) Attivo circolante	9.151	46.882	B) Fondi per rischi e oneri	-	-
IV. Disponibilità liquide			C) Trattamento di fine rapporto	-	-
1. Depositi bancari	9.151	46.882	D) Debiti	98	1
			12. Altri debiti	98	1
D) Ratei e Risconti attivi	1.064	98	E) Ratei e Risconti passivi	-	-
TOTALE ATTIVO	518.775	118.088	TOTALE PASSIVO	518.775	118.088

RENDICONTO GESTIONALE AL 31 DICEMBRE 2023

(Schema decreto ministeriale n. 39 del 5 marzo 2020: Mod B)

PROVENTI E RICAVI		
	2023	2022
A) Ricavi, rendite e proventi da attività di interesse generale	641.508	242.152
1. a. Apporti dei Fondatori x progetti di ricerca	240.000	240.000
1. b. Apporti dei Fondatori x acquisto terreno	400.000	-
4. Erogazioni liberali	200	1.200
5. Proventi del 5 per mille	1.308	952
B) Ricavi, rendite e proventi da attività diverse	-	-
C) Ricavi, rendite e proventi da attività di raccolta fondi	-	-
D) Ricavi, rendite e proventi da attività finanziarie e patrimoniali	5.589	2.508
1. Da rapporti bancari	-	908
2. Da altri investimenti finanziari	1.547	1.600
3. Da patrimonio immobiliare	4.042	-
E) Proventi di supporto generale	-	-
Totale proventi e ricavi	647.097	244.660
ONERI E COSTI		
	2023	2022
A) Costi e oneri da attività di interesse generale	240.000	240.000
1. Donazioni:		
a Humanitas per la Ricerca ETS	120.000	120.000
a Istituto di Ricerche Farmacologiche Mario Negri IRCCS	120.000	120.000
B) Costi e oneri da attività diverse	-	-
C) Costi e oneri da attività di raccolta fondi	-	-
D) Costo e oneri da attività finanziarie e patrimoniali	398.752	1.089
1. Su rapporti bancari e finanziari	18	1.089
4. Da altri beni patrimoniali, acquisto terreno	396.188	-
6. Altri oneri	2.546	-
E) Costi e oneri di supporto generale	3.943	2.373
5a. Ammortamenti immobilizzazioni immateriali	1.836	1.475
5b. Ammortamenti oneri pluriennali	823	823
7. Altri oneri e sopravvenienze passive	1.284	75
Totale costi e oneri	642.696	243.462
Avanzo d'esercizio	4.401	1.197

RELAZIONE DELL'ORGANO DI CONTROLLO MONOCRATICO BILANCIO SOCIALE E AL BILANCIO DI ESERCIZIO AL 31 DICEMBRE 2023

Nel corso dell'esercizio chiuso al 31 dicembre 2023 l'attività di vigilanza è stata ispirata alle disposizioni di legge di cui all'art. 30 del D.Lgs 117 del 3 luglio 2017 del Codice del Terzo Settore e alle Norme di comportamento dell'organo di controllo degli Enti del Terzo settore emanate dal Consiglio Nazionale dei Dottori Commercialisti e degli Esperti Contabili, pubblicate nel Dicembre 2020. L'attività di monitoraggio è stata svolta con l'osservanza delle finalità civiche, solidaristiche e di utilità sociale con particolare riguardo alle disposizioni di cui agli artt. 5, 6, 7 e 8 dello stesso Codice del Terzo Settore. Tale monitoraggio, ha avuto ad oggetto, in particolare, quanto segue:

- la verifica dell'esercizio in via esclusiva o principale di una o più attività di interesse generale di cui all'art. 5, co. 1, per finalità civiche, solidaristiche e di utilità sociale, in conformità con le norme particolari che ne disciplinano l'esercizio, nonché, eventualmente, di attività diverse da quelle indicate nell'art. 5, co. 1, del Codice del Terzo Settore, purché nei limiti delle previsioni statutarie e in base a criteri di secondarietà e strumentalità stabiliti con D.M. 19.5.2021, n. 107;
- il rispetto, nelle attività di raccolta fondi effettuate nel corso del periodo di riferimento, dei principi di verità, trasparenza e correttezza nei rapporti con i sostenitori e il pubblico, la cui verifica, nelle more dell'emanazione delle linee guida ministeriali di cui all'art. 7 del Codice del Terzo Settore, è stata svolta in base a un esame complessivo delle norme esistenti e delle *best practice* in uso;
- il perseguimento dell'assenza dello scopo di lucro, attraverso la destinazione del patrimonio, comprensivo di tutte le sue componenti (ricavi, rendite, proventi, entrate comunque denominate) per lo svolgimento dell'attività statutaria; l'osservanza del divieto di distribuzione anche indiretta di utili, avanzi di gestione, fondi e riserve a fondatori, associati, amministratori ed altri componenti degli organi sociali, tenendo conto degli indici di cui all'art. 8, co. 3, lett. da a) a e), del Codice del Terzo Settore.

Si riportano di seguito le risultanze dell'attività di monitoraggio svolta, in relazione agli aspetti sopra indicati e con riferimento alle relative disposizioni:

- la Fondazione persegue in via prevalente le attività di interesse generale costituite da donazioni ad istituti con finalità della ricerca nel campo delle malattie infettive del tessuto osteo-muscolare;
- la Fondazione non effettua attività diverse previste dall'art. 6 del Codice del Terzo Settore come indicato nella Relazione di missione;
- la Fondazione non ha posto in essere attività di raccolta fondi ma ha solo ricevuto donazioni dai soci fondatori e da terzi secondo le modalità previste dal Codice del Terzo Settore e dalle relative linee guida; ha inoltre correttamente rendicontato i proventi e i costi di tali attività nella Relazione di missione;
- la Fondazione ha rispettato il divieto di distribuzione diretta o indiretta di avanzi di gestione e del patrimonio; a questo proposito, ai sensi dell'art. 14 del Codice del Terzo Settore, non ha corrisposto emolumenti, compensi o corrispettivi a qualsiasi titolo ai componenti degli organi sociali;

Attestazione di conformità del Bilancio Sociale alle Linee guida di cui al decreto 4 luglio 2019 del Ministero del Lavoro e delle Politiche Sociali

Ai sensi dall'art. 30, comma 7, del Codice del Terzo Settore, ho svolto nel corso dell'esercizio 2023 l'attività di verifica della conformità del bilancio sociale, predisposto dalla "Fondazione Beppe e Nuccy Angiolini ETS", alle Linee guida per la redazione del bilancio sociale degli enti del Terzo settore, emanate dal Ministero del Lavoro e delle Politiche Sociali con D.M. 4 luglio 2019, secondo quanto previsto dall'art. 14 del Codice del Terzo Settore.

La "Fondazione Beppe e Nuccy Angiolini ETS" ha dichiarato di predisporre il proprio bilancio sociale per l'esercizio 2023 in conformità alle suddette Linee guida.

Ferma restando le responsabilità dell'organo di amministrazione per la predisposizione del bilancio sociale secondo le modalità e le tempistiche previste nelle norme che ne disciplinano la redazione, l'organo di controllo ha la responsabilità di attestare, come previsto dall'ordinamento, la conformità del bilancio sociale alle Linee guida del Ministero del Lavoro e delle Politiche Sociali.

All'organo di controllo compete inoltre di rilevare se il contenuto del bilancio sociale risulti manifestamente

incoerente con i dati riportati nel bilancio d'esercizio e/o con le informazioni e i dati in suo possesso.

A tale fine, ho verificato che le informazioni contenute nel bilancio sociale rappresentino fedelmente l'attività svolta dalla Fondazione e che siano coerenti con le richieste informative previste dalle Linee guida ministeriali di riferimento. Il mio comportamento è stato improntato a quanto previsto in materia dalle Norme di comportamento dell'organo di controllo degli enti del Terzo settore, pubblicate dal CNDCEC nel dicembre 2020. In questo senso, ho verificato anche i seguenti aspetti:

- conformità della struttura del bilancio sociale rispetto all'articolazione per sezioni di cui al paragrafo 6 delle Linee guida;
- presenza nel bilancio sociale delle informazioni di cui alle specifiche sotto-sezioni esplicitamente previste al paragrafo 6 delle Linee guida.
- rispetto dei principi di redazione del bilancio sociale di cui al paragrafo 5 delle Linee guida, tra i quali i principi di rilevanza e di completezza che possono comportare la necessità di integrare le informazioni richieste esplicitamente dalle linee guida.

Sulla base del lavoro svolto attesto che il Bilancio Sociale della "Fondazione Beppe e Nuccy Angiolini ETS" è stato redatto, in tutti gli aspetti significativi, in conformità alle previsioni delle Linee guida di cui al D.M. 4 luglio 2019.

Osservazioni in ordine al Bilancio di Esercizio

Il Bilancio di esercizio che mi è stato sottoposto, è stato redatto in conformità all'art. 13 del D.Lgs. n. 117 del 3 luglio 2017 e del D.M. n. 39 del 5 marzo 2020 del Ministero del Lavoro e delle Politiche Sociali, così come integrato dall'OIC 35 Principio contabile ETS che ne disciplinano la redazione; il bilancio evidenzia un avanzo d'esercizio di euro 4.401,36. Il bilancio è stato messo a mia disposizione nei termini statutari. A norma dell'art. 13, co. 1, del Codice del Terzo Settore esso è composto da Stato Patrimoniale, Rendiconto Gestionale e Relazione di Missione.

In assenza di un soggetto incaricato della revisione legale, ho verificato che gli schemi di bilancio fossero conformi a quanto disposto dal D.M. 5 marzo 2020 del Ministero del Lavoro e delle Politiche Sociali e la rispondenza del bilancio e della relazione di missione ai fatti e alle informazioni di rilievo di cui ero a conoscenza a seguito della partecipazione alle riunioni degli organi sociali, dell'esercizio dei miei doveri di vigilanza, dei miei compiti di monitoraggio e dei miei poteri di ispezione e controllo.

Per quanto a mia conoscenza, gli amministratori, nella redazione del bilancio, non hanno derogato alle norme di legge ai sensi dell'art. 2423, co. 5, c.c.

Ai sensi dell'art. 2426, n. 5, c.c. ho espresso il mio consenso all'iscrizione nell'attivo dello stato patrimoniale di oneri pluriennali per € 848,28.

Proposta in ordine alla approvazione del Bilancio di Esercizio

Considerando le risultanze dell'attività da me svolta, invito il Consiglio di Amministrazione ad approvare il bilancio d'esercizio chiuso al 31 dicembre 2023, così come redatto dagli Amministratori. Concordo con la proposta di destinazione del risultato di gestione pari a € 4.401,36 a incremento del patrimonio libero come formulata dall'organo di amministrazione.

Milano, 25 Febbraio 2024



*Dott. Paolo Gullotta, Revisore Unico
Fondazione Beppe e Nuccy Angiolini ETS*

Come sostenere la Fondazione

Si può sostenere la Fondazione al fine di potere finanziare ulteriori progetti nell'ambito della ricerca delle infezioni del tessuto osteo-muscolare in due modi: **con il 5 per mille o con le donazioni**.

Il 5 per mille: che cos'è e come si dona

Il 5 per mille, spesso indicato come "5x1000", è una **quota dell'imposta sul reddito** delle persone fisiche (IRPEF) che lo Stato italiano distribuisce tra **organizzazioni non profit ed enti del Terzo Settore**, impegnati in attività di interesse sociale ed iscritti agli appositi elenchi dell'Agenzia delle Entrate.

Non si tratta di una vera e propria donazione: non si beneficia quindi di agevolazioni fiscali, ma allo stesso tempo **non comporta oneri aggiuntivi** in quanto il cittadino è tenuto comunque a pagare l'IRPEF. Infatti, questa quota viene trattenuta dallo Stato in ogni caso: tuttavia destinando in modo consapevole il 5 per mille, il cittadino compie una donazione **senza alcun costo o aggravio fiscale**.

Come donare il 5xmille. È semplice, basta apporre la firma ed il codice fiscale della **Fondazione Beppe e Nuccy Angiolini ETS** cod. fisc. **97795610159** nell'apposita casella della propria **dichiarazione dei redditi** come segue:

SOSTEGNO DEGLI ENTI DEL TERZO SETTORE ISCRITTI NEL RUNTS DI CUI ALL'ART. 46, C. 1, DEL D.LGS. 3 LUGLIO 2017, N. 117, COMPRESSE LE COOPERATIVE SOCIALI ED ESCLUSE LE IMPRESE SOCIALI COSTITUITE IN FORMA DI SOCIETA', NONCHE' SOSTEGNO DELLE ONLUS ISCRITTE ALL'ANAGRAFE	
FIRMA	<input checked="" type="checkbox"/>
Codice fiscale del beneficiario (eventuale)	<input type="text" value="97795610159"/>

Le altre donazioni alla Fondazione

Si possono effettuare donazioni alla **Fondazione Beppe e Nuccy Angiolini ETS**, **beneficiando di agevolazioni fiscali**. Per ottenere il beneficio fiscale si può utilizzare un bonifico bancario a:

IntesaSanPaolo - IBAN: IT98K 03069 096061 00000 154885 BIC: BCITITMM
Ersel Banca Privata - IBAN: IT41V 03258 01600 CC023 0022205 BIC: CIBITMMXXX

Il bonifico deve riportare:

Dati del Donatore: **Nome, Cognome e Codice Fiscale**

Beneficiario: **Fondazione Beppe e Nuccy Angiolini ETS, Codice Fiscale 97795610159**

La Fondazione rilascerà ricevuta valida anche per le deduzioni / detrazioni previste dalla normativa fiscale vigente, per le persone fisiche e le persone giuridiche. Per le persone fisiche l'erogazione è alternativamente:

- detraibile dall'imposta lorda ai fini IRPEF per un importo pari al 30% dell'erogazione liberale effettuata, nei limiti di Euro 30.000 annui (art. 83 comma 1 del D.Lgs 117/2017);
- deducibile dal reddito complessivo netto nei limiti del 10% del reddito complessivamente dichiarato (art. 83 comma 2 del D.Lgs 117/2017).

Per gli enti e le società l'erogazione è deducibile dal reddito complessivo netto nei limiti del 10% del reddito complessivamente dichiarato (art. 83 comma 2 del D.Lgs 117/2017).

Per poter ottenere la ricevuta è necessario comunicare i dati del donatore (Nome, Cognome e Codice Fiscale) e l'e.mail o l'indirizzo a cui inviarla) a: fondazionebeppeenuccyangiolini@gmail.com.

QR CODE Bilancio Sociale 2020



QR CODE Bilancio Sociale 2021



QR CODE Bilancio Sociale 2022



FONDAZIONE BEPPE E NUCCY ANGIOLINI ETS

Sede legale: 20121 Milano - Via Agnello 19

Iscritta nel Registro Unico Nazionale Terzo Settore Regione Lombardia – sezione “C – Enti Filantropici”

Codice Fiscale: 97795610159 - Codice Destinatario: SUBM70N

IBAN IntesaSanPaolo: IT98K 03069 096061 00000 154885

Fondo di Dotazione Euro 100.000,00 – Patrimonio Netto Euro 518.676,99