



Nov korak v prihodnost regenerativne
medicine z naprednimi celičnimi terapijami
**Paving the Future of Regenerative Medicine
with Advanced Cell Therapies**
Spianando la strada al futuro della medicina
rigenerativa con terapie cellulari avanzate

ECOSYSTEM FOR ADVANCED REGENERATIVE MEDICINE THERAPIES

Ekosistem za napredne terapije na področju regenerativne
medicine

Ecosistema per le Terapie Avanzate di Medicina Regenerativa

Interreg

ITALIA-SLOVENIJA



ARTE



UNIONE EUROPEA
EVROPSKA UNIJA

PAVING THE FUTURE OF REGENERATIVE MEDICINE WITH ADVANCED CELL THERAPIES

Proceedings at the end of the ARTE project (Interreg ITA-SLO): Ecosystem for Advanced Regenerative Medicine Therapies

Authors: Antonio Sfiligoj, Frank Barry, Andrej Cör, Klemen Čamernik, Paolo Di Benedetto, Giovanni Loser

Editor: Jasna Lojk (FFA, UL)

Editorial board: Janja Marc (FFA, UL), Urška Rauter (Technology Park Ljubljana), Matjaž Jeras (FFA, UL)

Design: Jasna Lojk (FFA, UL), front page logo Rostfrei d.o.o.

Translation: TAIA INT, d.o.o.

Printing and binding: Birografika Bori d.o.o.

Printed in 150 copies

Published by: Faculty of Pharmacy, University of Ljubljana, Chair for clinical biochemistry, Ljubljana, Slovenia

The preparation for this publication was financed by ARTE project (Interreg ITA-SLO).

Ljubljana, December 2020

The articles were reviewed by two reviewers. The authors themselves are responsible for the scientific content of the papers.

NOV KORAK V PRIHODNOST REGNERATIVNE MEDICINE Z NAPREDINIMI CELIČNIMI TERAPIJAMI

Zbornik ob zaključku ARTE projekta (Interreg ITA-SLO): Ekosistem za napredne terapije na področju regenerativne medicine

Avtorji: Antonio Sfiligoj, Frank Barry, Andrej Cör, Klemen Čamernik, Paolo Di Benedetto, Giovanni Loser

Urednica: Jasna Lojk (FFA, UL)

Uredniški odbor: Janja Marc (FFA, UL), Urška Rauter (Tehnološki park Ljubljana), Matjaž Jeras (FFA, UL)

Oblikovanje: Jasna Lojk (FFA, UL), logo na naslovnici Rostfrei d.o.o.

Prevod: TAIA INT, d.o.o.

Tisk in vezava: Birografika Bori d.o.o.

Naklada 150 tiskanih izvodov

Izdala in založila: Univerza v Ljubljani, Fakulteta za Farmacijo, Katedra za klinično biokemijo, Ljubljana, Slovenija

Priprava publikacije je bila financirana s strani ARTE projekta (Interreg ITA-SLO).

Ljubljana, december 2020

Članki so bili recenzirani s strani dveh recenzentov. Za znanstveno vsebino prispevkov odgovarjajo avtorji sami.

SPIANANDO LA STRADA AL FUTURO DELLA MEDICINA RIGENERATIVA CON TERAPIE CELLULARI AVANZATE

Atti al termine del progetto ARTE (Interreg ITA-SLO): Ecosistema per le Terapie Avanzate di Medicina Regenerativa

Autori: Antonio Sfiligoj, Frank Barry, Andrej Cör, Klemen Čamernik, Paolo Di Benedetto, Giovanni Loser

Caporedattore: Jasna Lojk (FFA, UL)

Redazione: Janja Marc (FFA, UL), Urška Rauter (Parco tecnologico Lubiana), Matjaž Jeras (FFA, UL)

Design: Jasna Lojk (FFA, UL), logo sulla copertina Rostfrei d.o.o.

Traduzione: TAIA INT, d.o.o.

Stampa e rilegatura: Birografika Bori d.o.o.

Tiratura 150 copie stampate

Emesso e pubblicato: Facoltà di Farmacia, Università di Lubiana, Dipartimento di Biochimica Clinica Lubiana, Slovenia

La preparazione della pubblicazione è stata finanziata dal progetto ARTE (Interreg ITA-SLO).

Lubiana, dicembre 2020

Gli articoli sono stati esaminati da due revisori. Gli autori stessi sono responsabili del contenuto scientifico degli articoli.

CIP - Kataložni zapis o publikaciji

Narodna in univerzitetna knjižnica, Ljubljana

606:616-003.93(082)

602.9(082)

NOV korak v prihodnost regenerativne medicine z naprednimi celičnimi terapijami : ekosistem za napredne terapije na področju regenerativne medicine / [avtorji Antonio Sfiligoj ... [et al.] ; prevod Taia Int] = Paving the future of regenerative medicine with advanced cell therapies : ecosystem for advanced regenerative medicine therapies / [authors Antonio Sfiligoj ... [et al.] ; translation Taia Int] = Spianando la strada al futuro della medicina rigenerativa con terapie cellulari avanzate : ecosistema per le terapie avanzate di medicina rigenerativa / [autori Antonio Sfiligoj ... [et al.] ; traduzione Taia Int]. - Ljubljana : Faculty of Pharmacy, Chair for clinical biochemistry = Fakulteta za farmacijo, Katedra za klinično biokemijo = Facoltà di Farmacia, Dipartimento di Biochimica Clinica, 2021

ISBN 978-961-6378-88-8

COBISS.SI-ID 52815363

© 2021 University of Ljubljana, Faculty of Pharmacy

Project partners

Projektni partnerji

Partner di progetto



University of Ljubljana
Faculty of *Pharmacy*



biovalley
investments



TEHNOLOŠKI PARK
LJUBLJANA

01



ASU FC
Azienda sanitaria
universitaria
Friuli Centrale



REGIONE AUTONOMA
FRIULI VENEZIA GIULIA



Ortopediska bolnišnica Valdoltra
Ospedale ortopedico Valdoltra

Content / Vsebina / Indice:

Ecosystem for advanced regenerative medicine therapies

Antonio Sfiligoj: Introduction: What was it all about? _____	3
Frank Barry: European Regenerative Medicine for osteoarthritis, automated GMP manufacturing of ATMPs _____	6
Andrej Cör: Mesenchymal stem cells for osteoarthritis treatment: from idea to reality _____	9
Klemen Čamernik: Characterization of adipose tissue derived mesenchymal stem cells obtained by NANT001 _____	12
Paolo Di Benedetto: Microenvironment and AMSCs immunomodulation, GMP readiness in Italy _____	15
Antonio Sfiligoj: Relevance of the ARTE project for regional development _____	18
Giovanni Loser: Challenging companies to improve funding and promoting activities _____	22

Ekosistem za napredne terapije na področju regenerativne medicine

Antonio Sfiligoj: Uvod: za kaj pravzaprav gre? _____	29
Frank Barry: Evropska regenerativna medicina za osteoartrozo, avtomatizirana proizvodnja zdravil za napredno zdravljenje z dobro proizvodno prakso (DPP) _____	32
Andrej Cör: Mezenhimske matične celice za zdravljenje osteoartroze: od zamisli do resničnosti _____	35
Klemen Čamernik: Karakterizacija mezenhimskih matičnih celic iz maščobnega tkiva, pridobljenih z NANT001 _____	38
Paolo Di Benedetto: Mikrookolje in imunomodulacija amnijskih mezenhimskih matičnih celic, pripravljenost na dobro proizvodno prakso v Italiji _____	41
Antonio Sfiligoj: Pomen projekta ARTE za regionalni razvoj _____	44
Giovanni Loser: Izziv za podjetja, da izboljšajo financiranje in spodbujanje dejavnosti _____	48

Ecosistema per le Terapie Avanzate di Medicina Rigenerativa

Antonio Sfiligoj: Introduzione: di cosa si tratta? _____	53
Frank Barry: Medicina Rigenerativa Europea per l'osteoartrosi, fabbricazione automatizzata di ATMP con GMP _____	56
Andrej Cör: Cellule staminali mesenchimali per il trattamento dell'osteoartrosi: dall'idea alla realtà _____	59
Klemen Čamernik: Caratterizzazione di cellule staminali mesenchimali derivate dal tessuto adiposo ottenute con NANT001 _____	62
Paolo Di Benedetto: Microambiente e immunomodulazione di AMSC, GMP in Italia _____	65
Antonio Sfiligoj: Rilevanza del progetto ARTE per lo sviluppo regionale _____	68
Giovanni Loser: Sfidare le aziende a migliorare i finanziamenti e promuovere le attività _____	72



Ecosystem for advanced regenerative medicine therapies

Content:

Introduction: What was it all about? _____	3
Antonio Sfiligoj, CEO VivaBioCell, ARTE Project lead	
European Regenerative Medicine for osteoarthritis, automated GMP manufacturing of ATMPs _____	6
prof. dr. Frank Barry, REMEDI, Regenerative Medicine Institute Galway (IRL)	
Mesenchymal stem cells for osteoarthritis treatment: from idea to reality _____	9
prof. dr. Andrej Cör, MD, Valdoltra Orthopaedic Hospital, Slovenia	
Characterization of adipose tissue derived mesenchymal stem cells obtained by NANT001 _____	12
assist. dr. Klemen Čamernik, Faculty of Pharmacy, University of Ljubljana, Slovenia	
Microenvironment and AMSCs immunomodulation, GMP readiness in Italy _____	15
dr. Paolo Di Benedetto, MD, University Hospital Udine (ASUFC), Italy	
Relevance of the ARTE project for regional development _____	18
Antonio Sfiligoj, VivaBioCell CEO, ARTE project Lead	
Challenging companies to improve funding and promoting activities _____	22
Giovanni Loser, CEO of BioValley Investments	



Introduction: what was it all about

Antonio Sfiligoj, CEO VivaBioCell, ARTE Project lead

ARTE, a new cross-border Ecosystem for Regenerative Medicine supported by INTERREG, has helped establish the Slovenia-Italy area as an international hub for ground-breaking cell therapies. Patients have been treated, collaborations worth over 2.5 million euro have been activated, creating 20 new high-skilled jobs - by now.

With a financial allocation of more than 90 million euro for the 2014-2020 period, Interreg V-A Italy-Slovenia - was a fundamental programme to promote innovation and cross-border cooperation for a more competitive, cohesive, and livable area. ARTE, for Advanced Regenerative Medicine Therapies Ecosystem, has primed collaborations between Hospitals, small and medium-sized enterprises (SMEs), investors, research institutions, and supporting organizations in the promising new field of regenerative medicine - with a budget of 1.285.297 euro.

This novel therapeutic approach applies living cells to regenerate tissues to tackle a wide range of oncological, musculoskeletal, skin and other diseases. Innovative, safe and effective therapies are leading to improved quality of life for patients. Regenerative medicine is also a fast-growing market, valued 50 billion euro by 2025, with over one thousand clinical trials underway. ARTE's initial focus has been Osteoarthritis, a disabling disease affecting over 10% of the adult population and 50% of people over 60.

The Slovenia-Italy area appears well-positioned to take advantage of this opportunity, as it boasts excellent clinical, entrepreneurial, and institutional resources. Strong cooperation is essential to bring ground-breaking therapies to patients, attract private investment, and create entrepreneurial and employment growth.

By joining efforts thanks to ARTE, the Partners have clinically applied regenerative medicine to knee osteoarthritis, using cell products manufactured using an innovative, cost-effective automated bioreactor (the NANT "GMP in a Box"). With the mission of making regenerative medicine for musculoskeletal diseases accessible to patients while generating new opportunities for SME innovation and investment, ARTE has achieved the following results:

A first-time clinical research on knee-osteoarthritis. 10 patients have been treated at the Partner OB Valdoltra, Ankaran, with encouraging preliminary results. Additional 10 patients will be enrolled at the Partner ASUFC – the University Hospital of Udine.

Establishment of an international regenerative medicine HUB. ARTE has strengthened collaborations among a core group of 3 research centers/hospitals and 2 biomedical networks, encompassing over 450 SMEs. This core Group already has strong associates in Italy, Ireland, Sweden, Spain, Israel, and the United States. Researchers have published two scientific papers in peer-reviewed journals, while three additional articles are under preparation. Early clinical fall-outs

of collaborations established through ARTE have proven effective during the COVID-19 pandemic when patients in Udine have been treated with cell products manufactured in Ljubljana. Based on this experience, a research proposal involving 13 partners has been submitted to the EU IMI Programme, and an investigational study is now ongoing in Los Angeles. ARTE has led to IMMUNOCLUSTER, a new INTERREG SLOVENIA-ITALIA project now undergoing to develop a therapy for TNBC – Triple Negative Breast Cancer with Celica Biomed, Ljubljana as project leader. ARTE has opened the way to pre-clinical research on autologous cell products' applicability for difficult wounds (diabetic ulcers, deep burns) – financed by the PREFER POR-FESR Friuli Venezia Giulia Project.

Breakthrough innovations in cell manufacturing developed to improve cost and scalability. Six innovative suppliers have been contracted to develop innovative cell-factory management software and imaging sensors to improve productivity and quality compliance.

Several socio-economic gains. During the ARTE project period, over 2.5 million euro private investments into SMEs have been attracted from private investors, generating a direct employment impact of 18 highly skilled personnel. Additional investments and employment are expected as a follow-up to the 10 SMEs presented to investors. Many more companies have participated in numerous exhibitions, workshops, and other events.

In summary, ARTE INTERREG Italy-Slovenia V-A has primed a durable change in the area's competitiveness, creating a notable HUB in the fast-growing world ecosystem of advanced cell therapies benefits for patients, research, companies, employees, and the economy in general.

PARTNERS



VIVABIOCELL, Lead Partner, is a former spin-off of the University of Udine. The company has developed a breakthrough "GMP in a Box" system that improves cell manufacturing to reach a higher number of patients.

ORTHOPEDIC HOSPITAL VALDOLTRA, Ankaran, Slovenia, and **ASUFC – AZIENDA SANITARIA UNIVERSITARIA DEL FRIULI CENTRALE**, Udine, Italy, are the research hospitals that have developed and implemented protocols using cells manufactured by the "GMP in a BOX" system.



The **TECHNOLOGY PARK LJUBLJANA**, Slovenia, and **BIOVALLEY INVESTMENTS**, Trieste, Italy, are the SME and investment support organizations that have engaged respective SME networks, coaching entrepreneurs to present themselves to risk capital investors.



University of Ljubljana
Faculty of *Pharmacy*

FACULTY OF PHARMACY, University of Ljubljana, Slovenia, has conducted applied research and validations of the "GMP in a Box".



REMEDI – the regenerative medicine institute of Galway (IRL), as external partner, has provided scientific inputs, training and linking to EU research and innovation programs.

ARTE has also been endorsed by the Central Health Directorate of the Regione Autonoma Friuli Venezia Giulia and by the National Institute of Public Health of the Republic of Slovenia.



CELLULAR TREATMENTS FOR OSTEOARTHRITIS: EVIDENCE, MECHANISM AND VALUE

Frank Barry

Remedi, Regenerative Medicine Institute, Galway, Ireland,
www.remedi.ie



Of all the diseases that impact the musculoskeletal system, osteoarthritis is by far the most prevalent, with a profound impact on quality of life of patients, very significant societal and economic cost, and the fact that disease prevalence increases in ageing populations. Today, all treatments target the symptoms rather than the cause and no approved intervention prevents progressive destruction of the joint, much less promote regeneration. Invasive surgical treatment and joint replacement is thus the prevailing option in terms of frequency of procedure and costs in the US and throughout the world. The need for new treatments is thus very compelling and urgent.

Mesenchymal stromal cells have been at the forefront of efforts to develop new treatments for arthritic disease since the first identification of these cells by Alexander Friedenstein in the 1960s. However, many will argue that that evolution is not yet complete and the current standards applied for the characterisation of MSCs are quite inadequate (1,2).

Our work in this field focused on assessment of effectiveness of autologous derived MSCs is in the treatment of osteoporosis of the knee. In the ADIPOA Clinical study, financed under the EU Horizon Programme, we used autologous fat derived MSCs for the treatment of moderate to severe osteoarthritis of the knee. The patients first underwent a small liposuction procedure, in which a small (50-60 g) sample of fat was removed, from which a purified population of MSC cells was obtained and expanded over a period of approximately two weeks. MSCs were then sent back to the hospital and injected into the patient's knee joint. However, this isolation and expansion protocol is a manual, highly demanding, expensive and complicated process, which was recognized as one of the main vulnerabilities of this whole testing and treatment process. We thus spent some time on these manufacturing protocols to make them more efficient.

The patients who received the cell into their knee joint reported a reduction in pain within 24 h of the injection as measured with the VAS pain scores, and this effect was sustained through the duration of the study (Figure 1A). Similarly, the functional performance of the knees as measured by the WOMAC score increased within one week of the treatment and was sustained up to one year throughout the course of the study (Figure 1B). The obtained results of this phase 1 clinical study indicated that the procedure was safe (there were no reports of adverse events associated with cell delivery in the patients) and there was early evidence of a positive outcome (3). Please mind, that this was a non-labelled, non-blinded and no-placebo controlled study with a small number of patients, which, however, helped us to inform a subsequent larger clinical study ADIPOA2, which is currently underway – also under the EU Horizon Programme.

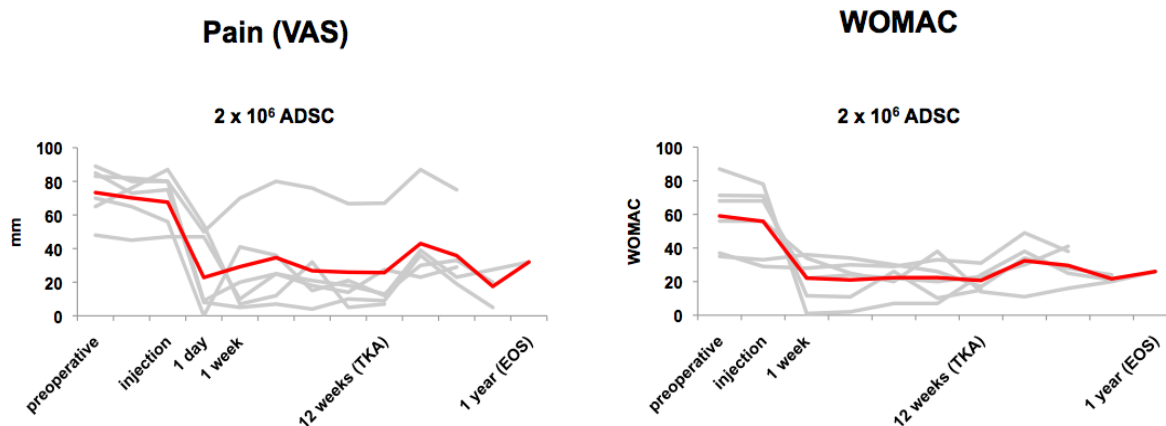


Figure 1: Results of ADIPOA clinical study. VAS pain scores (A) and WOMAC functional performance scores (B) were measured at different time points following injection of autologous adipose tissue derived MSCs. Both measurements showed rapid and sustained improvement.

ADIPOA2 is a randomised placebo controlled double blinded clinical trial with more than 150 patients with mild to moderate osteoarthritis that takes place in ten clinical sites across Europe with three manufacturing centres producing the cells. Hopefully, by the end of this clinical study in 2021, we will have statistically supported results, which will tell us whether or not this treatment is effective as a treatment protocol for osteoarthritis.

There is a great diversity in methods and protocols that researchers use for preparation of MSCs for clinical use. This is one of the most unstandardized, inconsistent technologies; there is great variety in expansion and isolation techniques, tissue source used, culture variables and media formulations, as well as the method of administration of obtained MSCs. Each of these parameters is a strong effector of MSC quality. This lack of standardisation is an important obstacle in the field, which affects the quality of the obtained MSC and consequently the consistency and comparability of obtained clinical results.

In order to overcome the protocol diversity and other manufacturing challenges, automated solutions have been proposed. We devised the AutoStem workflow (EU Horizon project) that includes all key steps in the manufacturing process, from tissue aspiration, cell expansion in a bioreactor, quality analysis and storage (Figure 2). This workflow can be fully automated and be carried out without any human intervention in a closed aseptic compartment. In the AutoStem robotic platform, two robotic arms handle all the steps of the workflow. This enables complete performance consistency for each step, and guaranteed sterility. It can operate continuously, which significantly reduces the costs. Moreover, several platforms can work simultaneously, enabling a larger scale production of MSC cells for therapeutic use. This prototype has been built, tested and validated (4).

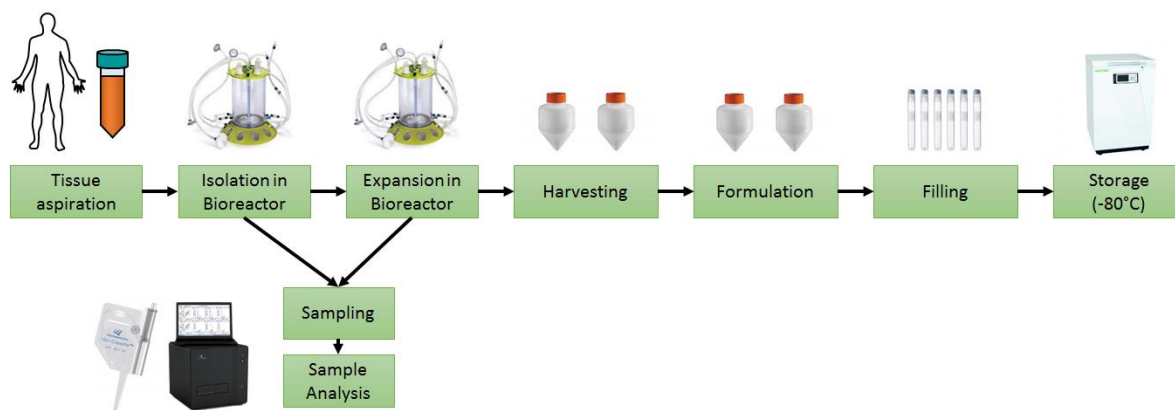


Figure 2: Schematic representation of AutoStem automated pipeline process workflow for expansion and analysis of MSCs for clinical use.

Another automated MSC expansion platform is NANT 001 (Figure 3), developed by VivaBioCell. This is an automated bioreactor for small to medium batch production, also suitable for expansion of autologous MSCs. The NANT 001 was tested by REMEDI under strict GMP protocols and conditions



Figure 3: NANT 001 VivaBioCell Automated bioreactor

and we obtained the same quality MSC phenotype as previously obtained with traditional protocols. Moreover, compared to traditional manual processing, the NANT 001 system is more efficient, with less need for personnel, operates continuously and enables multiple simultaneous productions, allowing a higher throughput with lower costs.

Both proposed automated platforms, the large-scale AutoStem and the smaller NANT 001, provide ideal solutions for better, more consistent, standardised and safer manufacturing, and could represent the next step towards a better, and standardised manufacturing technology.

References

1. Robb KP, Fitzgerald JC, Barry F, Viswanathan S. Mesenchymal stromal cell therapy: progress in manufacturing and assessments of potency. *Cytherapy*. 2019 Mar;21(3):289–306.
2. Barry F. MSC Therapy for Osteoarthritis: An Unfinished Story. *J Orthop Res Off Publ Orthop Res Soc*. 2019 Jun;37(6):1229–35.
3. Pers Y-M, Rackwitz L, Ferreira R, Pullig O, Delfour C, Barry F, et al. Adipose Mesenchymal Stromal Cell-Based Therapy for Severe Osteoarthritis of the Knee: A Phase I Dose-Escalation Trial. *Stem Cells Transl Med*. 2016 Jul;5(7):847–56.
4. Rafiq QA, Twomey K, Kulik M, Leschke C, O’Dea J, Callens S, et al. Developing an automated robotic factory for novel stem cell therapy production. *Regen Med*. 2016 May 11;11(4):351–4.

MESENCHYMAL STEM CELLS FOR OSTEOARTHRITIS TREATMENT: FROM IDEA TO REALITY

Andrej Cör

Valdoltra Orthopaedic Hospital,

Ankaran; Slovenia andrej.coer@ob-valdoltra.si



Ortopediska bolnišnica Valdoltra
Ospedale ortopedico Valdoltra

Osteoarthritis is the most common form of arthritis affecting millions of people worldwide. It is estimated that approximately 9.6 % of men and 18% of women who are over 60 years old have symptomatic osteoarthritis worldwide (1). As the global population ages, it has been forecasted that more than 20 % of the population will be suffering from osteoarthritis and more than 40 million will be severely disabled by 2050. The current therapeutic strategies of osteoarthritis include non-pharmacological, pharmacological and surgical treatment with the primary goal to reduce pain and improve function and quality of life. Surgical replacement of joint with joint prosthesis revolutionized the treatment of arthritic joint. In the Orthopedic Hospital Valdoltra more than 2.000 joint prostheses are inserted annually, however, due to the prosthesis loosening more than 200 revision operations were performed each year for prosthesis replacement.

Currently, there is no effective therapy that can reverse the progressive nature of osteoarthritis. Mesenchymal stem cells (MSC) represent the revolution in osteoarthritis treatment. Numerous reports from *in vitro* and *in vivo* studies provided the evidence about MSC differentiation into certain cell types such as chondrocytes (2). However, two key observations are important: First, the retention of MSC injected in the OA joint is very low, typically around 3%, indicating that the majority of cells disappear within a few days, and second, only a tiny proportion of the retained cells are attached to the cartilage surface (3). Growing evidence from recent studies strongly suggests focusing on MSC's paracrine properties including the release of extracellular vesicles containing many regulatory substances with anti-inflammatory and immunomodulatory effects (4).

Our aim in the ARTE project was to transfer the idea of treating knee osteoarthritis with MSC into clinical practice.

Our first task and at the same time a problem was to prepare the exact protocol. We found in the literature more than a hundred studies with very different protocols in terms of inclusion and exclusion criteria, process variables in the preparation of MSCs as well as follow up procedures (2, 5). We developed our own protocol, which allowed us to apply to the regulatory authorities for all the necessary approvals. Our study had to be approved by the Ethics Commission of the Republic of Slovenia. We had to submit an application to the Public Agency of the Republic of Slovenia for Medicinal Products and Medical Devices to become a donor centre for adipose tissue. We had to register doctors for treatment with advanced therapy. All this bureaucratic work was time consuming.

Because of the high cost of cell expansion procedure, we were able to include into the study just ten patients with osteoarthritis grade 3 for treatment with expanded MSCs. The control group consisted of ten patients with osteoarthritis grade 3 who received hyaluronic acid. Eligible patients were between 45 and 62 years of age with osteoarthritis of the knee joint grade 3. According to DOSES (International Expert Consensus on a Cell Therapy Communication Tool) our cell therapy was autologous, adipose tissue derived; enzymatic isolated and laboratory culture expanded cells; with 90% viability that express CD90, CD73, CD105 and not expressing CD45, CD19, CD11, CD34; and injected intra articular in the patient knee.

Patients were followed with regular checking at 3 and 6 months after the injection. Our preliminary results indicate improvement of pain assessment compared with the baseline VAS score at 3 months after MSC injection. The VAS for the knee pain decreased from 7 to 3.6 and 4.4 after 3 and 6 months, respectively. The patients in the control group did not show significant improvement after 3 or 6 months. The intra-articular injection of MSCs was also associated with improvement of the WOMAC score at 3 as well as at 6 months after injection compared to baseline WOMAC score. Again, WOMAC score did not improve significantly in the control group (Figure 1). We did not observe any treatment-related adverse events.

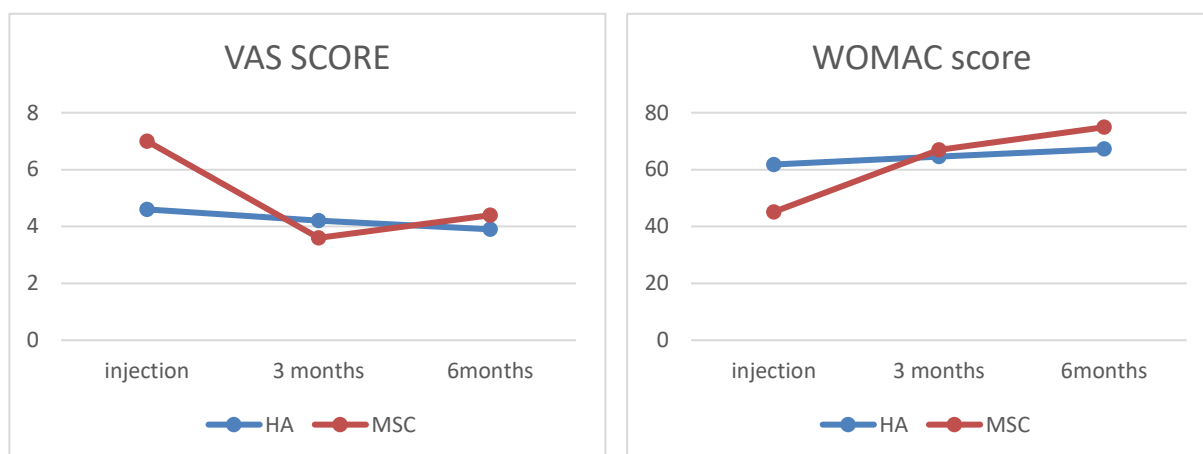


Figure 1: Changes in VAS for knee pain and WOMAC score during 3 and 6 months after intraarticular injection in the Mesenchymal Stem Cell (MSC) group and Hyaluronic acid (HA) as control group.

Main conclusions

Regenerative medicine is one of the most dynamic fields of science and medicine. In recent years, progress has been made in the area of MSC therapy, but due to the ARTE project even greater progress has been made in our knowledge about cell therapy and skills on how to translate an idea into reality in clinical practice. This, however, was essentially the purpose of the ARTE project. In the future, we have to work hand in hand - doctors in clinics by preparing optimal treatment protocols, and companies that will improve the isolation and cultivation of cells and of course agencies for the regulation of such treatment. The only guideline, however, must be the well-being of our patients.

References

1. Zhang Y, Jordan JM. Epidemiology of osteoarthritis. *Clin Geriatr Med* 2010;26: 355-69.
2. Barry F. MSC therapy for osteoarthritis: an unfinished story. *J Orthop Res* 2019; 37:1229-35.
3. Lukomska B, Stanaszek L, Zuba –Surma E, Legozs P, Sarzynski A, Drela K. Chalanges and controversies in human mesenchymal stem cell therapy. *Stem Cells Int* 2019; 9628536.
4. Mancuso P, Raman S, Glyn A, Barry F, Murphy. Mesenchymal stem cell therapy for osteoarthritis: The critical role of the cell secretome. *Front Bioeng Biotechnol* 2019; 7: 9.
5. Lee WS, Kim HJ, Kim KI, Kim GB, Jin W. Intra-articular injection of autologous adipose tissue-derived mesenchymal stem cells for the treatment of knee osteoarthritis: a phase IIb randomized placebo-controlled clinical trial. *Stem Cells Translat Med* 2019; 8: 504-11.

CHARACTERIZATION OF ADIPOSE TISSUE DERIVED MESENCHYMAL STEM CELLS OBTAINED BY NANT001

Klemen Čamernik, Janja Marc

University of Ljubljana, Faculty of pharmacy, Ljubljana,
Slovenia, janja.marc@ffa.uni-lj.si



University of Ljubljana
Faculty of Pharmacy

Mesenchymal stromal/ stem cells (MSCs) are a heterogenic population of multipotent cells which have the capacity to regenerate tissues after trauma of injury and to replenish worn out tissues and senescent cells (1). Once thought to be limited to the bone marrow, we now know these cells are located in most adult tissues in the body and can be easily isolated by different enzymatic and non-enzymatic methods (2). Once isolated these cells have the capability to expand and differentiate into several lineages of the mesodermal line, such as osteoblasts, adipocytes, and chondrocytes. In recent years it has been shown that these cells also have the ability to modulate the immune system after being exposed to different inflammatory cytokines such as TNF α and IL-1 β (2). These characteristics make MSCs very attractive for use in cellular therapies. To achieve a maximal therapeutic effect however, a substantial number of cells is necessary, which requires *in vitro* expansion. This can pose a problem as prolonged culturing of cells has been shown to affect their characteristics (3). In recent years, different automated bioreactors have been designed to optimize cell isolation and expansion under GMP conditions.

The aim of our work was to analyze the characteristics of adipose tissue derived mesenchymal stem cells (AD-MSC) which were obtained and expanded using the NANT001 bioreactor and to ultimately assess the suitability of this bioreactor for cell isolation and expansion.

For this purpose, we obtained 10 samples of lipoaspirates which were used to prepare the stromal vascular fraction (SVF) containing AD-MSC. The SVF was then seeded onto 636 cm² culture dishes and incubated in the NANT001 bioreactor for 14 days. After that time, the colony forming unit (CFU) test was performed and the cells were harvested for further expansion, proportion of CFU at passage 1 and yield analysis. After expansion at p1 one aliquot of cells was used for surface marker analysis using flow cytometry and one aliquot was used for AD-MSC licensing. For flow cytometry we analyzed CD90, CD73 and CD105 as positive markers and CD11, CD14, CD45 and CD34 as negative markers. AD-MSC licensing was performed by incubating the AD-MSC with a combination of 1 ng/ μ l of IL-1 β and 1ng/ μ l of TNF α for 24h. An untreated control experiment was performed in parallel. After that time, the total RNA was isolated and the change in expression of genes such as IL-6, IL-1 β , CCL5, TSG6, IDO, IL-1Ra and iNOS were measured.

The results of the CFU test performed on the SVF and the expended AD-MSC, together with the yield and average expansion times are show in Table 1. The average proportion of CFUs in the SVF is 0.71 % whereas the average proportion in the expanded cells is 12.53 %. The cells were expanded for an average time of 8.3 days after which time the average yield was 39.49 million cells.

Table 1: Results of colony forming unit test for both the stromal vascular fraction and the expanded adipose tissue derived mesenchymal stromal/stem cells

SAMPLE	Stromal vascular fraction		Expanded ASC			
	Number of seeded nuclear cells (10 ⁶)	Proportion of CFU in the SVF (%)	Number of seeded CFU	Expansion time in NANT (days)	Yield (10 ⁶)	Proportion of CFU-F of expanded ASCs
ASC 1	31	0,99%	307.556	7	39,10	10,90%
ASC 2	48,8	0,10%	46.745	8	35,70	5,50%
ASC 3	6,8	0,41%	27.562	11	45,80	12,60%
ASC 4	5,2	0,37%	19.459	10	31,60	17,50%
ASC 5	26,3	0,35%	91.569	8	40,20	8,50%
ASC 6	15,05	1,65%	247.751	7	15,69	24,08%
ASC 7	40	0,33%	131.697	8	32,15	12,27%
ASC8	30,8	1,49%	459.369	7	50,67	7,79%
ASC 9	21	0,46%	97.442	9	52,44	4,06%
ASC 10	35,1	0,91%	319.598	8	51,56	22,06%
AVERAGE	26,01	0,71%	174.875	8,3	39,49	12,53%

The results of positive and negative marker analysis show that AD-MSK from all samples conform to the minimal criteria set by the International Society for Cellular Therapy in 2006. The results for each sample are shown in Figure 1.

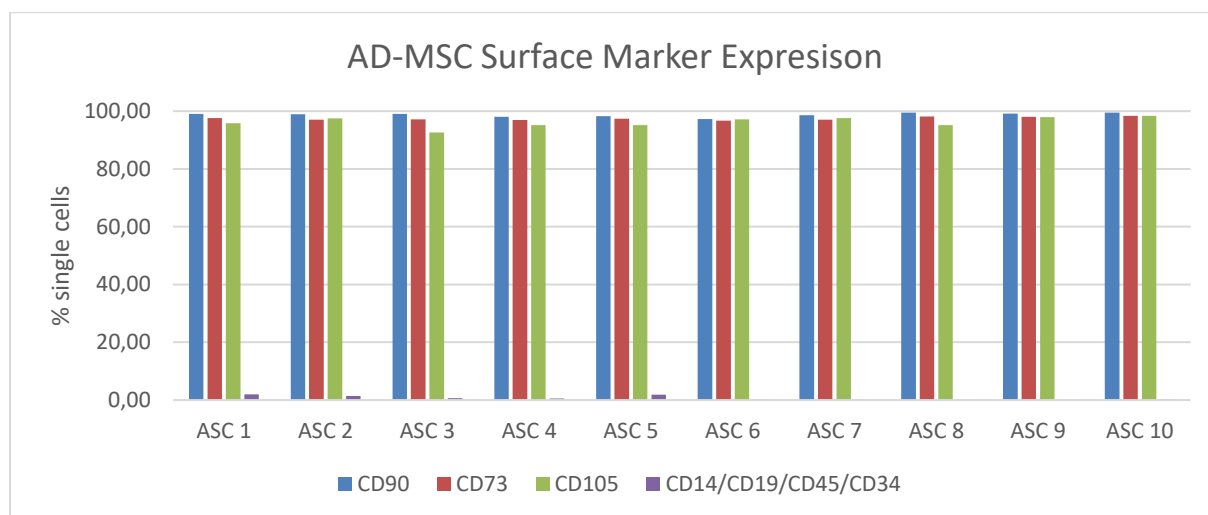


Figure 1: Results of immunophenotyping of expanded adipose tissue derived mesenchymal stromal/stem cells by flow cytometry.

Cell licensing was performed to determine if cells isolated and expanded with the NANT001 bioreactor can respond to an inflammatory environment. Results of gene expression shown in Figure 2 confirm that there is indeed an increase in the expression of IL-6, IL-1Ra, TSG6, IL-1 β , CCL5 and IDO. No increase in the expression of iNOS was observed, however.

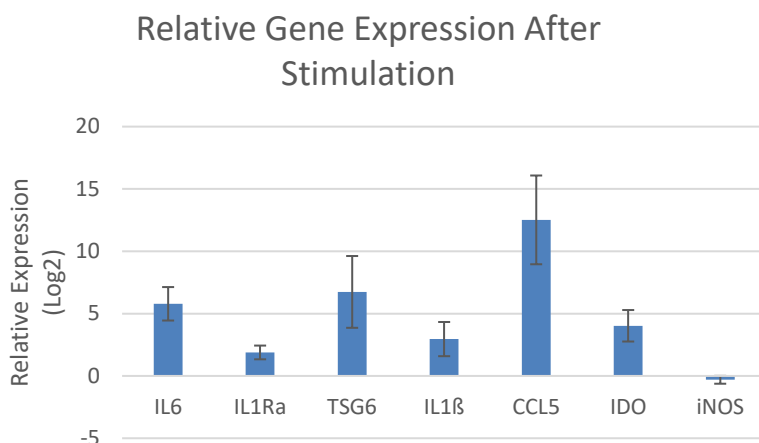


Figure 2: Results of gene expression analysis after cell licencing

Main conclusions

We evaluated the characteristics of AD-MSC expanded in NANT001 to determine whether the NANT001 bioreactor is a suitable option for expansion of cells used in cellular therapies. Our results show, that AD-MSC expanded in the NANT001 bioreactor have a high proportion of CFUs and a good yield after 8 days of expansion. We have also shown that the immunophenotype of the expanded cells is in accordance with the criteria set by the ISCT. In addition, upon stimulation with inflammatory cytokines, these cells are activated and have the capability to modify inflammation. These results therefore show that the NANT001 bioreactor is indeed an efficient option for AD-MSC expansion.

Acknowledgments

The authors thank Dr. Ariana Barlič and the staff at Educell d.o.o for the use of the NANT001 bioreactor and Lucija Ana Vrščaj from the University of Ljubljana, Faculty of pharmacy for her valuable assistance.

References

1. Čamernik K, Mihelič A, Mihalič R, Haring G, Herman S, Marolt Presen D, et al. Comprehensive analysis of skeletal muscle- and bone-derived mesenchymal stem/stromal cells in patients with osteoarthritis and femoral neck fracture. *Stem Cell Res Ther* [Internet]. 2020 Dec 3;11(1):146.
2. Čamernik K, Barlič A, Drobnič M, Marc J, Jeras M, Zupan J. Mesenchymal Stem Cells in the Musculoskeletal System: From Animal Models to Human Tissue Regeneration? *Stem Cell Rev Reports*. 2018;14(3):346–69.
3. Čamernik K, Mihelič A, Mihalič R, Marolt Presen D, Janež A, Trebše R, et al. Skeletal-muscle-derived mesenchymal stem/stromal cells from patients with osteoarthritis show superior biological properties compared to bone-derived cells. *Stem Cell Res*. 2019;38.

MICROENVIRONMENT AND AMSCS IMMUNOMODULATION, GMP READINESS IN ITALY

Paolo Di Benedetto¹, Adriana Cifù²

1 DAME University of Udine – Clinic of Orthopedics ASUFC,
Udine, Italy, paolo.dibenedetto@asufc.sanita.fvg.it

2 DAME University of Udine – Institute of Pathology ASUFC,
Udine, Italy



As we well know, mesenchymal stem cells (MSCs) are multipotent stem cells with self-renewal capability. Cell therapy is based on the ability of MSCs to differentiate and replace damaged cells and on their paracrine and immunomodulatory activity (1). In fact, the soluble factors released by MSCs help to restore the homeostasis of the affected tissue.

Several clinical trials have shown that the injection of adipose-derived MSCs (AMSCs) improves the function of osteoarthritic joints by inhibiting the formation of osteophytes and reducing the degradation of cartilage (2). Recent studies have shown that the mechanisms by which MSCs act is through cell-to-cell contact and release of soluble factors, such as IL-10, TGFβ, PGE-2, NO and IDO, but the precise mechanism by which cells are able to modulate the immune response is not yet fully understood.

We know that macrophages are the most important cells in the inflammatory response of osteoarthritis and how they regulate the progression of this pathology. So, to better understand the impact of the articular microenvironment on the immunomodulatory properties of MSCs we have exposed adipose MSCs to synovial fluid taken from osteoarthritic joints and studied the immunomodulatory effect of their secretome on immune cells involved in disease progression: macrophages (M1-like and M2-like), dendritic cells, and T cells (3).

AMSCs were isolated from adipose tissue obtained by lipoaspirates from subcutaneous abdominal fat and characterized by flow cytometry. Osteoarthritic synovial fluids were collected from knee and characterized in terms of cytokines and chemokines by multiplex assay (Table 1).

To evaluate the effect of osteoarthritic synovial fluid on MSCs, the cells were cultured in conditioned medium containing 50% of synovial fluid. The exposure of cells to synovial fluid increased cell proliferation and promoted the release of cytokines and chemokines. In particular, exposure to osteoarthritic synovial fluid upregulated the production of chemokines such as CCL21, CCL27 and CXCL15 (3).

To understand the impact of the articular microenvironment on the immunomodulatory properties of MSCs after injection into the joint, we have exposed AMSCs to synovial fluid taken from osteoarthritic joints and studied the immunomodulatory effect of their secretome on the immune

cells involved in disease progression: macrophages (M1-like and M2-like), dendritic cells, and T cells (3).

Table 1: Chemokines and cytokines in osteoarthritic synovial fluid (3).

Analyte	pg/ml	Analyte	pg/ml	Analyte	pg/ml
CCL1	41.6 ± 8.8	CCL24	390.2 ± 12.7	CXCL16	925 ± 36.5
CCL2	338.3 ± 276.7	CCL25	353 ± 54.3	CX3CL1	42.1 ± 7.9
CCL3	6.8 ± 2.6	CCL26	28.9 ± 8.3	IL-1β	1.4 ± 0.5
CCL7	44.4 ± 2.7	CCL27	499.6 ± 211.2	IL-2	6.4 ± 1.5
CCL8	19.1 ± 6.7	CXCL1	87 ± 13	IL-4	15.1 ± 3.3
CCL11	20.7 ± 4.9	CXCL2	21.1 ± 5.8	IL-6	68.2 ± 31.8
CCL13	6.8 ± 1.2	CXCL5	145.5 ± 34.4	IL-10	13.5 ± 1.6
CCL15	4762.5 ± 501.3	CXCL6	6.5 ± 0.4	IL-15	506.4 ± 34.1
CCL17	12 ± 3.1	CXCL8	21.6 ± 10	IFN-γ	27.9 ± 6
CCL19	92.8 ± 19.5	CXCL9	171.2 ± 50.4	GM-CSF	38.3 ± 4.9
CCL20	5.6 ± 0.7	CXCL10	246.6 ± 51.3	MIF	7846 ± 106.5
CCL21	3333.1 ± 22.9	CXCL11	6.5 ± 1.5	TNF-α	22.6 ± 8.2
CCL22	183.3 ± 43	CXCL12	833.8 ± 58.7		
CCL23	390.2 ± 12.7	CXCL13	11.3 ± 2.3		

In particular, to study the ability of AMSCs' secretome to induce an anti-inflammatory phenotype in macrophages, monocytes were differentiated in M1-like macrophages in the presence of AMSC conditioned medium of unstimulated AMSCs (CM) or synovial fluid exposed AMSCs (CM+SF) or synovial fluid only and we found that the M1-like cells treated with CM+SF showed an increase in M2-like markers such Arginase I and CD163 (Figure 1) (3).

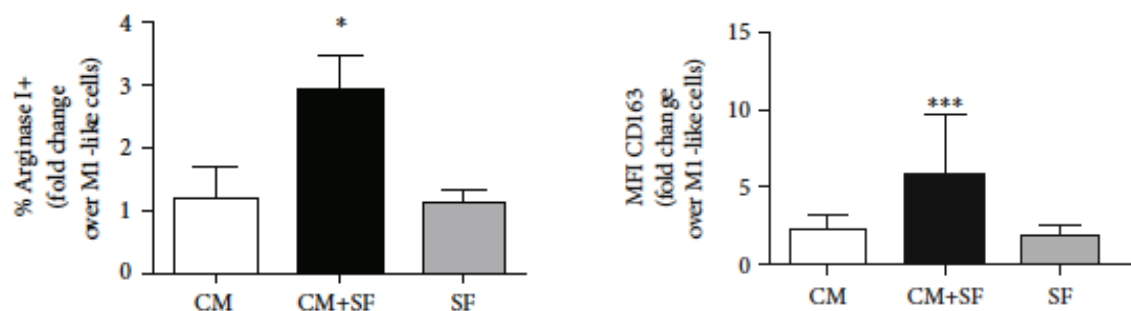


Figure 1: Increased expression of M2 like markers (Arginase I, CD 163) on M1 like cells exposed to conditioned medium plus synovial fluid (SF) (3).

The same experiment was performed for dendritic cells and there was an increase in the expression of CD14 and CD123 associated with the increase in IL-10 production. We also noted how the conditioned medium of synovial fluid-exposed AMSCs inhibits the proliferation of CD3+ T cells. At the same time mesenchymal stem cells exposed to synovial fluid increased significantly the expansion of Treg (3).

Previous studies have shown that the immunomodulatory properties of AMSCs are not constitutive, but rather activated by signals derived from a proinflammatory microenvironment. So, adipose

derived MSCs require "licensing" by proinflammatory cytokines to acquire an immunosuppressive phenotype. AMSCs' secretome is influenced by mutual interaction with immune cells and is affected by specific disease-related tissue microenvironments.

Our data demonstrated and confirmed the presence of proinflammatory molecules in osteoarthritic synovial fluid and that these influence the expression of molecules involved in immunomodulation through upregulation of release of several chemokines involved in the homing of various immune cells (3).

Main conclusions

In conclusion, our data suggest that the molecules present in osteoarthritic synovial fluid (TNF- α , IL-1 α , IL-1 β , IL-6, MMP-3, and MMP-9) are essential to induce stem cells to secrete immunomodulatory factors that inhibit dendritic cells differentiation, promote secretion of IL-10 (immunosuppressive factor), reverse macrophages M1 differentiation towards M2, inhibits secretion of TNF- α , reduce T-cell proliferation and induce expansion of T-reg cells. All of these promote the anti-inflammatory response, for this reason communication with the inflammatory microenvironment plays an essential role in determining the ability of MSCs to suppress the immune response (3).

Acknowledgments

This project was supported by the Programma di Cooperazione Interreg V A Italia-Slovenia Grant Interreg ARTE (J22F170001005) and an unrestricted grant from VivaBioCell S.p.A.

References

1. A. P. Ayala-Cuellar, J.-H. Kang, E.-B. Jeung, and K.-C. Choi, "Roles of mesenchymal stem cells in tissue regeneration and immunomodulation," *Biomolecules & Therapeutics*, vol. 27, no. 1, pp. 25–33, 2019
2. C. H. Jo, Y. G. Lee, W. H. Shin et al., "Intra-articular injection of mesenchymal stem cells for the treatment of osteoarthritis of the knee: a proof-of-concept clinical trial," *Stem Cells*, vol. 32, no. 5, pp. 1254–1266, 2014
3. Cifù A, Domenis R, Di Benedetto P, Curcio F et al. The Exposure to Osteoarthritic Synovial Fluid Enhances the Immunomodulatory Profile of Adipose Mesenchymal Stem Cell Secretome. *Stem Cells International* 2020; <https://doi.org/10.1155/2020/4058760>

RELEVANCE OF THE ARTE PROJECT FOR REGIONAL DEVELOPMENT

Antonio Sfiligoj, Francesco Vitrani, Flavia Mazzarol, Giacomo Cattaruzzi

VivaBioCell S.p.A., Udine, Italy, info@vivabiocell.it



The relevance of the pharmaceutical sector in Italy and Slovenia.

The research-based pharmaceutical industry can play a critical role in restoring Europe to growth and ensure future competitiveness in an advancing global economy. The sector is particularly important in Italy both in absolute and relative terms. It is also crucial in Slovenia, with a population of only 2 million, as indicated by the outstanding relevance indicators on a per-capita basis (Table 1).

Table 2: Economic Relevance of Pharma, Italy, Slovenia, Europe – EFPIA, 2018

	Italy	Slovenia	Europe
Production	€ 30,010 million	€ 1,936 million	€ 248,053 million
R&D	€ 1,470 million	€ 180 million	€ 34,949 million
Employment	64,400	9,493	747,607

Thanks to advances in science and technology, the research-based pharmaceutical industry is entering an exciting new era in medicines development. **Regenerative Medicine (RM)** is a novel therapeutic approach that applies living cells to regenerate tissues to tackle a wide range of oncological, musculoskeletal, skin, and other diseases. With over one thousand clinical trials underway, therapies prove to be safe and effective and are leading to improved quality of life for patients. Regenerative medicine is also a fast-growing market, valued 50 billion euro worldwide by 2025. **Emerging, new, biopharmaceutical companies, accounting for over 70% of the research pipeline, are vital to this vibrant sector.** However, as highlighted by the **new Pharmaceutical Strategy for Europe** [1], RM puts the European ecosystem at an important crossroads:

- Advanced Therapy Medicinal Products (ATMPs), specifically cell and gene therapies, are "major milestones" of healthcare progress.
- RM would require a new business model to address the shift in cost from chronic to a one-time treatment.
- A robust ecosystem is crucial to the industry, encompassing start-ups to large companies, from producers of patented medicines to manufacturers of medical devices to software developers.

Jointly, Friuli Venezia Giulia and Slovenia boast the essential strengths. Research hospitals and universities, several diversified high-tech companies, technology parks, enterprise-supporting organizations, investors, and other sector stakeholders are already active at the forefront of RM. However, there is consciousness that the available clinical, business and intellectual resources need

to collaborate to meet their full potential for bringing RM therapies to patients while creating wealth through continuous breakthrough innovations brought to market.

ARTE, a pathfinding project, and regional development growth model

There is no best pathway to regional development concerning breakthrough innovations, such as Regenerative Medicine. Each region is subject to a unique set of opportunities, constraints, and competitive conditions.

The Interreg V-A, Italy-Slovenia ARTE project, has supported a core group of SMEs, Hospitals, and investors to collaborate for a more competitive, cohesive, and livable area. The Project Partners have been: VivaBioCell S.p.A., Udine, Italy (Lead Partner), the University Hospital of Udine (ASUFC), Italy, the National Orthopedic Clinic OB Valdoltra, Ankaran, Slovenia, the Faculty of Pharmacy of the University of Ljubljana, Slovenia, the Technology Park of Ljubljana, Slovenia and BioValley Investments, Trieste, Italy.

Ecosystem-building methodology

The Business Ecosystem model [2] has been pursued to involve and support technology companies that have global market potential, putting in place new forms of “collaborative business models” for continuous innovation. This implies above all a business-oriented, open-minded, and dynamic approach, and the capability to activate SME networks in Slovenia, Friuli Venezia Giulia and Italy, as well as globally. Other implemented methodologies include: **Open Innovation, Product Platforming (3), and Tech Risk Array (4)**.

By improving cross border cooperation among Hospital structures, R&D Centers, Universities, SMEs, and Technology Parks, ARTE has had the following development objectives:

- achieve high competitiveness in the field of regenerative medicine,
- attract Investment and financial resources,
- prime SME Growth,
- generate new employment.

FOCUS: ARTE's focus has been Osteoarthritis, a disabling disease affecting over 10% of the adult population and 50% of people over 60. By building upon the achievements of the previous EU Horizon projects, the Partners worked together to make regenerative medicine for musculoskeletal diseases become affordable.

VivaBioCell's Keystone role, “Keystone organizations play a crucial role in business ecosystems. Fundamentally, they aim to improve their ecosystems' overall health by providing a stable and predictable set of common assets that other organizations use to build their offerings. keystones can increase ecosystem productivity by simplifying the complex task of connecting network participants to one another or creating new products by third parties more efficient. They can enhance ecosystem robustness by consistently incorporating technological innovations and providing a reliable point of reference that helps participants respond to new and uncertain conditions. And they can encourage ecosystem niche creation by offering innovative technologies to a variety of third-party organizations.”[2]

VivaBioCell also established scientific links between ARTE and REMEDI – The Regenerative Institute at the National University Galway Ireland, a Partner in the EU Horizon ADIPOA Clinical Trials..

Results by the numbers:

- 5 Clinical research centers collaborating on new therapies
- 12 public and private organizations involved in innovation
- 10 SMEs involved in implementing project activities
- 80 employees of companies and SMEs involved
- 50 researchers (ATMP production and clinical studies)
- 12 start-ups; involvement of risk capital
- 3 biomedical innovations transferred to SMEs
- 40 SME belonging to networks
- 19 NEW EMPLOYEES
- OVER 2.5 million € PRIVATE INVESTMENTS ATTRACTED FROM PRIVATE INVESTORS

Main results:

- The Interregional Regenerative Medicine Hub is now operational
- A Therapeutic Applications pipeline established, including TNBC – Triple Negative Breast Cancer (Interreg Italia-Slovenia ImmunoCluster Project; LP Celica Biomed d.o.o.);
- FAC – Fight Against Coronavirus consortium formed, submitting a Research Proposal to the IMI EU Programme; IND Investigational New Drug study approved by FDA (US)

Breakthrough innovations in cell manufacturing developed around the NANT XL system.

Improving Cell Product Manufacturing is central to improve the affordability of new therapies, letting more patients benefit from new solutions. VivaBioCell’s automated bioreactors (“GMP-in-a-Box”) contribute to improving the cost and scalability of manufacturing.

ARTE contributed to developing the next generation family of bioreactors that will embed innovations from several SME suppliers. New solutions include the development of a new software suite to scale production and new optical sensors.

Notably, ARTE has helped EDUCELL d.o.o., a manufacturer of cell therapy products, to gain expertise with “GMP in a Box” tools. This new competence has enabled the Slovenian SME to conclude new very promising international agreements and obtain funding for new investments.



THE VISION OF WORKING AHEAD, TOGETHER

Strong cooperation is essential to bring ground-breaking therapies to patients and create entrepreneurial and employment growth. Implementing the concerted approach outlined in Figure 1 may become the core experiment of a new “Slovenia-Italia Collaborative Advanced Therapies Hub,” which would have significant European value as a test-bed for new initiatives in the high-tech sector of Regenerative Medicine. The Hub would encompass various Stakeholders and address both Lead Demand (e.g., public Hospitals and administrations), Innovative Offer (products, services, intellectual property, clinical research), and have an EU/international reach.

1. Regional Clinical Referrals

- Expand Regional R&D (clinical; MedTech; IT)
- Collaboration with Local Research Hospitals
- Phase I/II Clinical Studies

3. Capitalization of expertise

- Global and regional hubs
- Address technical and scientific concerns
- Exploit fastest growing healthcare market

2. Cell Product Manufacturing

- State of the arte biomanufacturing: lower costs, standardization
- Decentralized, automated production: close to patients' bed
- Automated, transferrable manufacturing
- Patient access to novel Therapies

4. Licensing Partnerships

- Licensing Therapies
- Address technical and scientific concerns
- Investments, enterprise growth
- Sustainable healthcare and research

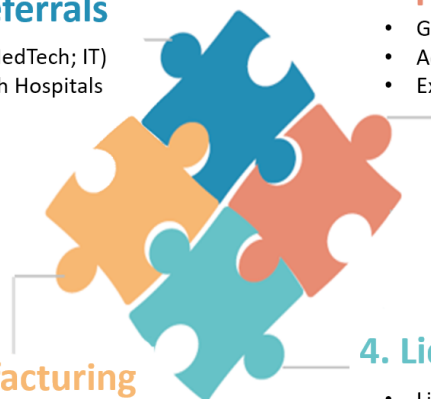


Figure 3: Key Steps for Strengthening the RM Ecosystem in the Region

Main conclusions

In summary, ARTE INTERREG Italy-Slovenia V-A has been a precursor project aligned to the new Pharmaceutical Strategy for Europe. It has primed a durable change in the area's competitiveness, creating a notable HUB in the fast-growing European and global ecosystem of advanced cell therapies, benefiting patients, research, companies, employees, and the economy in general.

Acknowledgments

ARTE has also been endorsed by the Central Health Directorate of the Regione Autonoma Friuli Venezia Giulia and by the National Institute of Public Health of the Republic of Slovenia.

References

1. Pharmaceutical Strategy for Europe EUROPEAN COMMISSION COM/2020/761
2. M. Iansiti and R. Levien Strategy as Ecology – The Keystone Advantage – Harvard Business Rev. 2004
3. H. Chesbrough - Open Business Models: How To Thrive In The New Innovation Landscape. Harvard Business Press. 2006
4. Gary S. Stacey, Antonio Sfiligoj - The Tech Risk Array to Integrate R&D. Battelle B-TIP. 2001

CHALLENGING COMPANIES TO IMPROVE FUNDING AND PROMOTING ACTIVITIES

Giovanni Loser

Biovalley Investments SpA, Italy, collaborator



The purpose of the established ecosystem was to provide funding, cross-border partnership and tutoring for innovative companies and fuel their transformation into large and successful businesses. Four innovative companies were selected for this initiative, three of them based in Slovenia and one in Italy:

- Animacel d.o.o. Slovenia, Stem cell therapy for dogs
- Educell d.o.o. Slovenia, Stem cell therapy
- Saving d.o.o. Slovenia, Medtech for heart monitoring
- Serichim s.r.l. Italy, Contract Research Organization

Over the time, these four selected Companies had different kind of experiences in raising funds and/or opportunities to present themselves.

THE ROLE OF BIOVALLEY INVESTMENTS

The Family Office is specialized in the marketing and sales of BioHighTech (BioMed, BioTech, BioICT) products, services, and investments in innovative companies operating in the life sciences, medical and digital markets. In the past six years (2015-2020), it started the incubation acceleration process of the BioHighTech target companies in the Friuli Venezia Giulia region with minority seed and startup capital investments, and also with the establishment and management of a network of BioHighTech companies. So far the Company has directly invested more than 4 million euro leveraging new value and third parties investments for more than 12 million euro.

THE FVG ECOSYSTEM

Trieste, the capital city of the Friuli Venezia Giulia region, has an elevated number of universities, research institutions and researchers and therefore it was appointed as the European Capital of Science 2020 and organized the European Science Forum (ESOF) 2020. The high density of researchers (37 researchers per 1000 employees) has grown exponentially in the past 40 years, thanks to large investments coming directly from the Italian government to Trieste, this border city, that was once on the border of the Iron Curtain.

The high concentration of researchers has allowed both the growth of a provincial density of innovative startups in Trieste, which is the highest in Italy and as well has helped transform Friuli Venezia Giulia into a strong innovator region with cross borders relationships.

HOW WE STRUCTURED MEETINGS TO EXECUTE TUTORING PROCESS?

Selected Companies had to:

- Present themselves and their past work
- Follow a Q&A process
- Understand relevant insights for investors

OVERALL OUTCOME OF THIS ACTIVITY

Based on meetings held with the selected Companies the main outcomes from a qualitative point of view were the following:

- Open and exclusive discussion on its own company
- Immediate evaluation on management capabilities and lack of them (if any)
- Founder/Management skills/B. Model and size of opportunity were finally perceived more relevant (as per ranking of the methodology) than product/service
- Need for focusing on simplified communication, clear business model and value generation process
- Validation from an industry investor before any possible exposure to funding market
- Addressing the funding process

IT HAS BEEN A LONG JOURNEY

The four companies went through a full tutoring process involving all their main activities. The methodology presented and discussed put them in a condition to re-think their core business and improve the readiness to meet the research and industrial ecosystem. Moreover the final pitch activity improved the capabilities to interact for funding activities with the financial community. Biovalley Investments became a reference partner to promote cross border projects and investments.

ANIMACEL

Animacel has been introduced to the Italian life science Ecosystem. This gave the company the opportunity to meet a Multinational Corporation for offering its products to be introduced in the US market (discussions still pending) and to meet a Lifescience Incubator. During the pitching session the company improved and better analyzed the competitive scenario reinforcing its value proposition. Animacel also signed a NDA for funding and business acceleration purposes with the Incubator.

SERICHIM

SERICHIM has been introduced to the Slovenian life science Ecosystem. This gave the company the opportunity to launch a cross border pharmaceutical project with the aim to activate a partnership with a Slovenian CRO and to pitch a Lifescience Italian Foundation signing a NDA with the target, still under process, to raise 1.5 million euro. The company also had the opportunity to pitch a Lifescience Italian VC signing a NDA. During the pitching session it received a clear direction on how to maximize value for a VC through a spin off activity.





Ekosistem za napredne terapije na področju regenerativne medicine

Vsebina:

Uvod: za kaj pravzaprav gre? _____	29
Antonio Sfiligoj, direktor podjetja VivaBioCell, vodja projekta ARTE	
Evropska regenerativna medicina za osteoartrozo, avtomatizirana proizvodnja zdravil za napredno zdravljenje z dobro proizvodno prakso (DPP) _____	32
prof. dr. Frank Barry, REMEDI, Inštitut za regenerativno medicino Galway (IRL)	
Mezenhimske matične celice za zdravljenje osteoartroze: od zamisli do resničnosti _____	35
prof. dr. Andrej Cör, dr. med., Ortopedska bolnišnica Valdoltra, Slovenija	
Karakterizacija mezenhimskih matičnih celic iz maščobnega tkiva, pridobljenih z NANT001 _____	38
asist. dr. Klemen Čamernik, Fakulteta za farmacijo, Univerza v Ljubljani, Slovenija	
Mikrookolje in imunomodulacija amnijskih mezenhimskih matičnih celic, pripravljenost na dobro proizvodno prakso v Italiji _____	41
dr. Paolo Di Benedetto, dr. med., Univerzitetna bolnišnica Videm (ASUFC), Italija	
Pomen projekta ARTE za regionalni razvoj _____	44
Antonio Sfiligoj, direktor podjetja VivaBioCell, vodja projekta ARTE	
Izziv za podjetja, da izboljšajo financiranje in spodbujanje dejavnosti _____	48
Giovanni Loser, direktor podjetja BioValley Investments	

Uvod: za kaj pravzaprav gre

Antonio Sfiligoj, direktor podjetja VivaBioCell, vodja projekta ARTE

ARTE, novi čezmejni ekosistem za regenerativno medicino, ki ga podpira INTERREG, je pomagal vzpostaviti območje Slovenije in Italije kot mednarodno središče za prelomne celične terapije. Do tega trenutka je bilo zdravljenih veliko pacientov, sodelovanje je potekalo v projektih v vrednosti več kot 2,5 milijona EUR, pri čemer je bilo ustvarjenih 20 novih visokokvalificiranih delovnih mest.

Z dodelitvijo več kot 90 milijonov finančnih sredstev za obdobje 2014–2020 je bil Interreg VA Italija-Slovenija temeljni program za spodbujanje inovacij in čezmejnega sodelovanja za ustvarjanje bolj konkurenčnega in povezanega območja z boljšimi življenjskimi pogoji. ARTE, ekosistem za napredne terapije na področju regenerativne medicine, je pripravil sodelovanje med bolnišnicami, malimi in srednje velikimi podjetji (MSP), vlagatelji, raziskovalnimi institucijami in podpornimi organizacijami na obetavnem novem področju regenerativne medicine - s proračunom 1.285.297 EUR .

Ta nov terapevtski pristop za regeneracijo tkiv za spopadanje s širokim spektrom onkoloških, mišično-skeletnih, kožnih in drugih bolezni uporablja žive celice. Inovativne, varne in učinkovite terapije vodijo k izboljšanju kakovosti življenja bolnikov. Regenerativna medicina je tudi hitro rastoč trg, do leta 2025 naj bi bil vreden 50 milijard EUR, v teku pa je več kot tisoč kliničnih preskušanj. Prvotni poudarek projekta ARTE je bil na osteoartrizi, bolezni, ki prizadene več kot 10 % odrasle populacije in 50 % ljudi, starejših od 60 let.

Zdi se, da ima območje Slovenije in Italije dobro lego za izkoriščanje te priložnosti, saj se ponaša z odličnimi kliničnimi, podjetniškimi in institucionalnimi viri. Tesno sodelovanje je bistvenega pomena za zagotavljanje revolucionarnih terapij pacientom, privabljanje zasebnih naložb in ustvarjanje podjetniške in zaposlitvene rasti.

S skupnimi prizadevanji po zaslugi projekta ARTE so partnerji klinično uporabljali regenerativno medicino za osteoartrozo kolena z uporabo celičnih izdelkov, izdelanih z uporabo inovativnega, stroškovno učinkovitega avtomatiziranega bioreaktorja (NANT »DPP v škatli«). S poslanstvom, da bi regenerativna zdravila za mišično-skeletne bolezni postala dostopna pacientom, hkrati pa bi se ustvarile nove priložnosti za inovacije in naložbe malih in srednjih podjetij, je projekt ARTE dosegel naslednje rezultate:

Prva klinična raziskava v zvezi z osteoartrozo kolena. V partnerski Ortopedski bolnišnici Valdoltra v Ankaranu so pri zdravljenju 10 pacientov dosegli vzpodbudne predhodne rezultate. Dodatnih 10 pacientov bo vključenih v partnersko bolnišnico ASUFC – Univerzitetno bolnišnico v Vidmu.

Ustanovitev mednarodnega vozlišča za regenerativno medicino. ARTE je okrepil sodelovanje med osrednjo skupino treh raziskovalnih centrov/bolnišnic in dveh biomedicinskih mrež, kar zajema več kot 450 malih in srednjih podjetij. Ta osrednja skupina že ima močne sodelavce v Italiji, na Irskem, Švedskem, v Španiji, Izraelu in ZDA. Raziskovalci so objavili dva znanstvena članka v strokovno

recenziranih revijah, v pripravi pa so še trije dodatni članki. Zgodnji klinični učinki sodelovanj, vzpostavljenih v okviru projekta ARTE, so se med pandemijo COVID-19 izkazali za učinkovite, ko so paciente v Vidmu zdravili s celičnimi izdelki, proizvedenimi v Ljubljani. Na podlagi teh izkušenj je bil v program EU IMI predložen predlog za raziskavo, ki je vključeval 13 partnerjev, v Los Angelesu pa trenutno poteka preiskovalna študija. V okviru projekta ARTE je bil ustvarjen tudi nov projekt v sklopu INTERREG SLOVENIA-ITALIA, projekt IMMUNOCLUSTER, ki je trenutno v fazi razvoja terapije za TNBC – trojno negativni rak dojke, projektni vodja pa je inštitut Celica Biomed iz Ljubljane. ARTE je utrl pot predkliničnim raziskavam o uporabnosti avtolognih celičnih izdelkov za zahtevnejše rane (diabetični ulkusi, globoke opekline), ki jih financira projekt PREFER POR-FESR Furlanije – Julijske krajine.

Prebojne inovacije na področju proizvodnje celic, razvite za boljšo stroškovno učinkovitost in nadgradljivost. Šest inovativnih dobaviteljev je sklenilo pogodbe za razvoj inovativne programske opreme za upravljanje celičnih tovarn in slikovnih senzorjev za izboljšanje produktivnosti in skladnosti z zahtevami za kakovost.

Številne socialno-ekonomske koristi. Med trajanjem projekta ARTE so zasebni vlagatelji v mala in srednja podjetja vložili več kot 2,5 milijona EUR, kar je omogočilo neposredno zaposlitev 18 visoko usposobljenih oseb. Vlagateljem je bilo predstavljenih 10 malih in srednjih podjetjih, v naslednjem koraku pa se pričakujejo dodatne naložbe in delovna mesta. Številnih predstavitev, delavnic in drugih dogodkov pa se je udeležilo še veliko več podjetij.

Če povzamemo, ARTE INTERREG Italija-Slovenija VA je povzročil trajno spremembo v konkurenčnosti območja in ustvaril opazno vozlišče v hitro rastočem svetovnem ekosistemu naprednih celičnih terapij za paciente, raziskav, podjetij, zaposlenih in gospodarstva na splošno.

PARTNERJI



VIVABIOCELL, vodilni partner, nekdanji del Univerze v Vidmu. Podjetje je razvilo revolucionarni sistem »DPP v škatli«, ki izboljšuje proizvodnjo celic, da je mogoče doseči večje število pacientov.

ORTOPEDSKA BOLNIŠNICA VALDOLTRA, Ankarana, Slovenija, in **ASUFC – AZIENDA SANITARIA UNIVERSITARIA DEL FRIULI CENTRALE**, Videm, Italija, sta raziskovalni bolnišnici, ki sta razvili in uvedli protokole z uporabo celic, proizvedenih v sistemu »DPP v ŠKATLI«.



TEHNOLOŠKI PARK LJUBLJANA, Slovenija, in **BIOVALLEY INVESTMENTS**, Trst, Italija, sta organizaciji za podporo malim in srednjim podjetjem in za naložbe, ki sta se vključili v zadevna omrežja malih in srednjih podjetij in podjetnike usposabljata o tem, kako se predstaviti vlagateljem tveganega kapitala.



TEHNOLOŠKI PARK
LJUBLJANA
01



biovalley
investments



University of Ljubljana
Faculty of Pharmacy

FAKULTETA ZA FARMACIJO, Univerza v Ljubljani, Slovenija, je izvedla aplikativne raziskave in validacije sistema »DPP v škatli«.



REMEDI – inštitut za regenerativno medicino v Galway (IRL) je kot zunanji partner zagotovil strokovno znanje, usposabljanje in povezovanje z raziskovalnimi in inovacijskimi programi EU.

ARTE sta podprla tudi Centralni direktorat za zdravje avtonomne regije Furlanija – Julijska krajina in Nacionalni inštitut za javno zdravje Republike Slovenije.



REGIONE AUTONOMA
FRIULI VENEZIA GIULIA



Nacionalni inštitut
za javno zdravje

CELIČNO ZDRAVLJENJE OSTEOARTROZE: DOKAZI, MEHANIZEM IN VREDNOST

Frank Barry

Remedi, Inštitut za regenerativno medicino, Galway, Irska,

www.remedi.ie

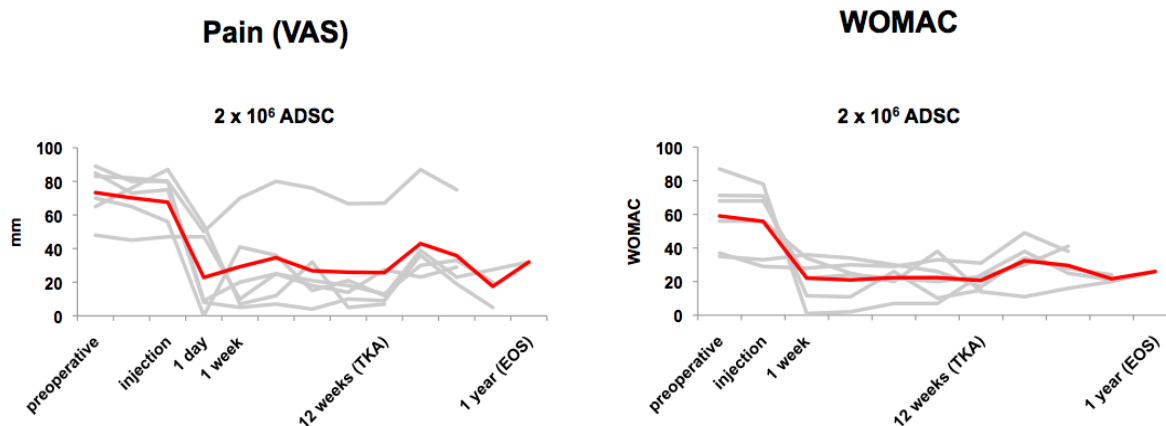


Od vseh bolezni, ki prizadenejo mišično-skeletni sistem, je osteoartroza daleč najbolj razširjena in močno vpliva na kakovost življenja pacientov ter terja zelo visoko družbeno in ekonomsko ceno, to pa še dodatno podkrepi dejstvo, da se razširjenost bolezni povečuje pri starajočem se prebivalstvu. Dandanes so vsi načini zdravljenja usmerjeni k simptomom in ne vzrokom, noben odobren poseg pa ne preprečuje postopnega uničenja sklepa, še manj pa spodbuja njegovo regeneracijo. V ZDA in po vsem svetu je invazivno kirurško zdravljenje in zamenjava sklepov je tako prevladujoča izbira v zvezi s pogostostjo posegov in stroški. Potreba po novih načinih zdravljenja je tako zelo aktualna in nujna.

Mezenhimske matične celice so v ospredju prizadevanj za razvoj novih načinov zdravljenja artritичne bolezni že od prvega odkritja teh celic, kar je v šestdesetih letih 20. stoletja uspelo Alexandru Friedensteinu. Vendar mnogi trdijo, da ta razvoj še ni končan in da so trenutni standardi, ki se uporabljajo za karakterizacijo mezenhimskih matičnih celic, precej neustrezni (1, 2).

Naše delo na tem področju, ki se osredotoča na oceno učinkovitosti avtologno pridobljenih mezenhimskih matičnih celic, zadeva zdravljenje osteoporoze kolena. V klinični študiji ADIPOA, financirani v okviru programa EU Horizon, smo za zdravljenje zmerne do hude osteoartroze kolena uporabili avtologne mezenhimske matične celice, pridobljene iz maščob. Na pacientih so najprej opravili manjšo liposukcijo, pri kateri so odstranili majhen (50–60 g) vzorec maščobe, iz katere so v približno dveh tednih pridobili in povečali prečiščeno populacijo mezenhimskih matičnih celic. Matične celice so nato poslali nazaj v bolnišnico in jih vbrizgali v pacientov kolenski sklep. Vendar pa gre pri tem protokolu izolacije in ekspanzije za ročen, zelo zahteven, drag in zapleten postopek, kar je bilo prepoznano kot ena glavnih slabosti celotnega postopka testiranja in zdravljenja. Zato smo nekaj časa namenili tem proizvodnim protokolom, da bi izboljšali njihovo učinkovitost.

Pacienti, ki so celice prejeli v kolenski sklep, so poročali o zmanjšanju bolečine v 24 urah po injiciranju, kar je bilo izmerjeno z oceno bolečine VAS, ta učinek pa se je ohranil skozi celotno trajanje študije (slika 1A). Tudi funkcionalna zmogljivost kolen, izmerjena z oceno WOMAC, se je v enem tednu po zdravljenju povečala in se med trajanjem študije ohranila do enega leta (slika 1B). Pridobljeni rezultati te klinične študije 1. faze so pokazali, da je bil poseg varen (pri pacientih ni bilo poročil o neželenih dogodkih, povezanih z vnosom celic), in ponudili zgodnje dokaze o pozitivnem izidu (3). Pri tem velja upoštevati, da je šlo za odprto, neslepo in s placebom nenadzorovano študijo z majhnim številom pacientov, ki pa nam je pomagala pridobiti informacije za naslednjo in večjo klinično študijo ADIPOA2, ki trenutno prav tako poteka v okviru programa EU Horizon.

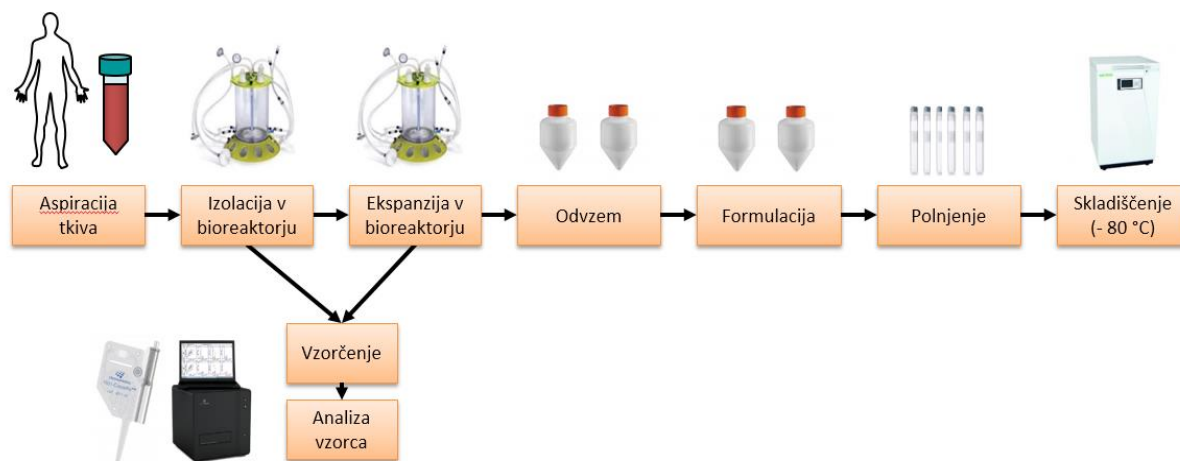


Slika 1: rezultati klinične študije ADIPOA. Ocene bolečine VAS (A) in ocene funkcionalne zmogljivosti WOMAC (B) so bile izmerjene na različnih časovnih točkah po injiciranju matičnih celic iz avtolognega maščobnega tkiva. Obe meritvi sta pokazali hitro in trajno izboljšanje.

ADIPOA2 je randomizirano s placebom nadzorovano dvojno slepo klinično preskušanje z več kot 150 pacienti z blago do zmerno osteoartrozo, ki poteka na desetih kliničnih lokacijah po Evropi, celice pa proizvajajo trije proizvodni centri. Upamo, da bomo do zaključka te klinične študije leta 2021 imeli statistično podprte rezultate, ki nam bodo povedali, ali je to zdravljenje učinkovit protokol zdravljenja osteoartroze ali ne.

Metode in protokoli, ki jih raziskovalci uporabljajo za pripravo mezenhimskih matičnih celic za klinično uporabo, so zelo raznoliki. Gre za eno najbolj nestandardiziranih in nedoslednih tehnologij; obstaja veliko razlik pri tehnikah ekspanzije in izolacije, uporabljenem izvoru tkiva, spremenljivkah kultur in formulacijah medijev ter tudi načinu odmerjanja pridobljenih mezenhimskih matičnih celic. Vsak od teh parametrov ima močan vpliv na kakovost mezenhimskih matičnih celic. Pomanjkanje standardizacije je pomembna ovira na tem področju, ki vpliva na kakovost pridobljenih celic in posledično na skladnost in primerljivost pridobljenih kliničnih rezultatov.

Da bi bili kos raznolikosti protokolov in drugim izzivom pri proizvodnji, so bile predlagane avtomatizirane rešitve. Pripravili smo delovni postopek AutoStem (projekt EU Horizon), ki vključuje vse ključne korake v proizvodnem procesu od aspiracije tkiva in ekspanzije celic v bioreaktorju do analize kakovosti in shranjevanja (slika 2). Ta delovni postopek je mogoče popolnoma avtomatizirati in izvajati brez človeškega posredovanja v zaprtem aseptičnem prostoru. V robotski platformi AutoStem dve robotski roki opravita vse korake delovnega postopka. To omogoča popolno skladnost pri izvajanju vsakega koraka in zagamčeno sterilnost. Postopek lahko deluje neprekinjeno, kar znatno zmanjša stroške. Poleg tega lahko hkrati deluje več platform, kar omogoča obsežnejšo proizvodnjo mezenhimskih matičnih celic za terapevtsko uporabo. Ta prototip je bil izdelan, preizkušen in potrjen (4).



Slika 2: Shematski prikaz delovnega postopka avtomatiziranega cevovoda AutoStem za ekspanzijo in analizo mezenhimskih matičnih celic za klinično uporabo.

Druga avtomatizirana platforma za ekspanzijo mezenhimskih matičnih celic je NANT 001 (slika 3), ki jo je razvilo podjetje VivaBioCell. Gre za avtomatiziran bioreaktor za proizvodnjo majhnih do srednje velikih serij, ki je primeren tudi za ekspanzijo avtoložnih mezenhimskih matičnih celic. REMEDI je preizkusil NANT 001 ob upoštevanju strogih protokolov in pogojev DPP, dobili pa smo enako kakovost fenotipa mezenhimskih matičnih celic, kot je bila predhodno pridobljena s tradicionalnimi



Slika 3: avtomatizirani bioreaktor NANT 001 VivaBioCell

protokoli. Poleg tega je sistem NANT 001 v primerjavi s tradicionalno ročno obdelavo učinkovitejši, zahteva manj osebja, deluje neprekinjeno in omogoča več hkratnih produkcij, kar omogoča večjo zmogljivost z nižjimi stroški.

Obe predlagani avtomatizirani platformi, obsežni AutoStem in manjši NANT 001, ponujata idealne rešitve za boljšo, bolj dosledno, standardizirano in varnejšo proizvodnjo in bi lahko predstavljali naslednji korak k boljši in standardizirani proizvodni tehnologiji.

Viri

1. Robb KP, Fitzgerald JC, Barry F, Viswanathan S. Mesenchymal stromal cell therapy: progress in manufacturing and assessments of potency. *Cytotherapy*. 2019 Mar;21(3):289–306.
2. Barry F. MSC Therapy for Osteoarthritis: An Unfinished Story. *J Orthop Res Off Publ Orthop Res Soc*. 2019 Jun;37(6):1229–35.
3. Pers Y-M, Rackwitz L, Ferreira R, Pullig O, Delfour C, Barry F, et al. Adipose Mesenchymal Stromal Cell-Based Therapy for Severe Osteoarthritis of the Knee: A Phase I Dose-Escalation Trial. *Stem Cells Transl Med*. 2016 Jul;5(7):847–56.
4. Rafiq QA, Twomey K, Kulik M, Leschke C, O’Dea J, Callens S, et al. Developing an automated robotic factory for novel stem cell therapy production. *Regen Med*. 2016 May 11;11(4):351–4.

MEZENHIMSKE MATIČNE CELICE ZA ZDRAVLJENJE OSTEOARTROZE: OD ZAMISLI DO RESNIČNOSTI

Andrej Cör



Ortopedska bolnišnica Valdoltra
Ospedale ortopedico Valdoltra

Ortopedska bolnišnica Valdoltra,
Ankaran, Slovenija; andrej.coer@ob-valdoltra.si

Osteoartroza je najpogostejša oblika artritisa, ki prizadene milijone ljudi po vsem svetu. Po ocenah približno 9,6 % moških in 18 % žensk, starejših od 60 let po vsem svetu, trpi za simptomatsko osteoartrozo (1). Ker se svetovno prebivalstvo stara, napovedujejo, da bo do leta 2050 več kot 20 % prebivalstva trpelo za osteoartrozo, več kot 40 milijonov ljudi pa bo imelo resne težave s to boleznijo. Sedanje terapevtske strategije za osteoartrozo vključujejo nefarmakološko, farmakološko in kirurško zdravljenje s primarnim ciljem zmanjšati bolečino ter izboljšati funkcijo in kakovost življenja. Kirurška zamenjava sklepa s sklepno protezo je korenito spremenila zdravljenje artritičnega sklepa. V ortopedski bolnišnici Valdoltra vsako leto vstavijo več kot 2.000 sklepnih protez, vendar je bilo zaradi omajanja proteze vsako leto opravljenih več kot 200 naknadnih posegov za zamenjavo proteze.

Trenutno ni učinkovite terapije, ki bi lahko obrnila tok progresivne narave osteoartroze. Mezenhimske matične celice (MSC) predstavljajo revolucijo v zdravljenju osteoartroze. Številna poročila iz *in vitro* in *in vivo* študij vsebujejo dokaze o diferenciaciji MSC v določene vrste celic, kot so hondrociti (2). Vendar sta pomembni dve ključni ugotovitvi: prvič, retencija celic MSC, vbrizganih v sklep z osteoartrozo, je zelo nizka, običajno približno 3 %, kar pomeni, da večina celic izgine v nekaj dneh, in drugič, le majhen delež zadržanih celic se pritrdi na površino hrustanca (3). Vse večje število dokazov iz nedavnih študij jasno kaže, da se moramo osredotočiti na parakrine lastnosti celic MSC, vključno s sproščanjem zunajceličnih veziklov, ki vsebujejo številne regulativne snovi s protivnetnimi in imunomodulatornimi učinki (4).

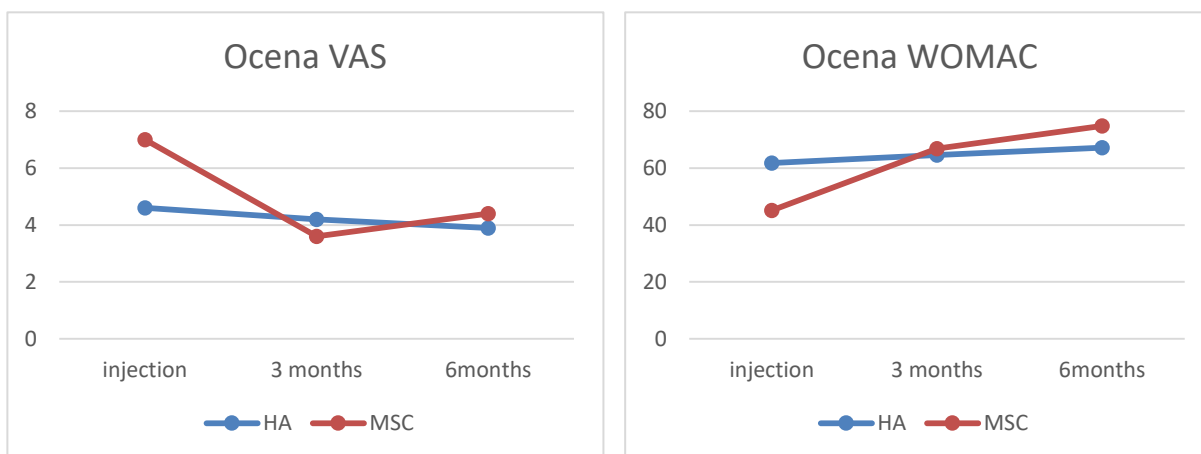
Naš cilj v projektu ARTE je bil prenesti zamisel o zdravljenju osteoartroze kolena s celicami MSC v klinično prakso.

Naša prva naloga in hkrati težava je bila priprava natančnega protokola. V literaturi smo našli več kot sto študij z zelo različnimi protokoli v smislu meril za vključitev in izključitev, spremenljivk procesa pri pripravi celic MSC in nadaljnjih postopkov (2, 5). Razvili smo lastni protokol, ki nam je omogočil, da se za potrebne odobritve obrnemo na regulativne organe. Našo študijo je morala odobriti Etična komisija Republike Slovenije. Na Javno agencijo RS za zdravila in medicinske pripomočke smo morali oddati prošnjo, da smo lahko postali donorski center za maščobno tkivo. Zdravnike smo morali registrirati za zdravljenje z napredno terapijo. Vse to birokratsko delo je bilo zamudno.

Zaradi visokih stroškov postopka ekspanzije celic smo v študijo lahko vključili le deset pacientov z osteoartrozo 3. stopnje za zdravljenje z ekspanziranimi celicami MSC. V kontrolni skupini je bilo

deset pacientov z osteoartrazo 3. stopnje, ki so prejeli hialuronsko kislino. V študijo so se lahko vključili pacienti, stari med 45 in 62 let z osteoartrazo kolenskega sklepa 3. stopnje. Glede na DOSES (mednarodni strokovni sporazum o komunikacijskem orodju za celično terapijo) je bila naša celična terapija avtologna, pridobljena iz maščobnega tkiva; z encimsko izoliranimi celicami, ki so bile ekspanzirane z laboratorijskimi kulturami; z 90-% viabilnostjo, in ki izražajo CD90, CD73, CD105 in ne izražajo CD45, CD19, CD11, CD34; in se injicirajo intraartikularno v pacientovo koleno.

Paciente so redno preverjali 3 in 6 mesecev po injiciranju. Naši predhodni rezultati kažejo na izboljšanje ocene bolečine v primerjavi z izhodiščno oceno VAS po treh mesecih po injiciranju celic MSC. Ocena VAS za bolečino v kolenu se je po treh mesecih zmanjšala s 7 na 3,6 in po šestih mesecih s 7 na 4,4. Pacienti v kontrolni skupini po 3 ali 6 mesecih niso izkazali bistvenega izboljšanja. Z intraartikularno injekcijo celic MSC smo povezali tudi izboljšanje ocene WOMAC tako po 3 kot po 6 mesecih po injiciranju v primerjavi z izhodiščno oceno WOMAC. Tudi tu se ocena WOMAC v kontrolni skupini ni bistveno izboljšala (slika 1). Nismo opazili nobenih neželenih učinkov, povezanih z zdravljenjem.



Slika 1: spremembe ocene VAS za bolečine v kolenu in ocene WOMAC med 3 in 6 meseci po intraartikularni injekciji v skupini z mezenhimskimi matičnimi celicami (MSC) in kontrolni skupini s hialuronsko kislino (HA).

Glavne ugotovitve

Regenerativna medicina je eno najbolj dinamičnih področij znanosti in medicine. V zadnjih letih je bil dosežen napredek na področju terapije s celicami MSC, vendar je bil zaradi projekta ARTE dosežen še večji napredek v našem znanju o celični terapiji in veščinah, kako to zamisel v klinični praksi prenesti v resničnost. To pa je bil v bistvu namen projekta ARTE. V prihodnosti moramo sodelovati z roko v roki – zdravniki na klinikah s pripravo optimalnih protokolov zdravljenja, podjetja, ki bodo izboljšala izolacijo in gojenje celic, in seveda agencije za regulacijo tovrstnega zdravljenja. Edino vodilo pa mora biti dobro počutje naših pacientov.

Viri

1. Zhang Y, Jordan JM. Epidemiology of osteoarthritis. *Clin Geriatr Med* 2010;26: 355-69.
2. Barry F. MSC therapy for osteoarthritis: an unfinished story. *J Orthop Res* 2019; 37:1229-35.
3. Lukomska B, Stanaszek L, Zuba –Surma E, Legozs P, Sarazynski A, Drela K. Challenges and controversies in human mesenchymal stem cell therapy. *Stem Cells Int* 2019; 9628536.
4. Mancuso P, Raman S, Glyn A, Barry F, Murphy. Mesenchymal stem cell therapy for osteoarthritis: The critical role of the cell secretome. *Front Bioeng Biotechnol* 2019; 7: 9.
5. Lee WS, Kim HJ, Kim KI, Kim GB, Jin W. Intra-articular injection of autologous adipose tissue-derived mesenchymal stem cells for the treatment of knee osteoarthritis: a phase IIb randomized placebo-controlled clinical trial. *Stem Cells Translat Med* 2019; 8: 504-11.

KARAKTERIZACIJA MEZENHIMSKIH MATIČNIH CELIC IZ MAŠČOBNEGA TKIVA, PRIDOBLENIH Z NANT001

Klemen Čamernik, Janja Marc

Univerza v Ljubljani, Fakulteta za farmacijo, Ljubljana,
Slovenija, janja.marc@ffa.uni-lj.si



University of Ljubljana
Faculty of Pharmacy

Mezenhimske stromalne/matične celice (MSC) so heterogena populacija multipotentnih celic, ki imajo sposobnost regeneracije tkiv po poškodbi in obnavljanja obrabljenih tkiv ter starajočih se celic (1). Nekoč smo mislili, da so omejene na kostni mozeg, zdaj pa vemo, da se te celice nahajajo v večini odraslih tkiv v telesu in jih je mogoče zlahka izolirati z različnimi encimskimi in ne-encimskimi metodami (2). Ko so te celice izolirane, so se sposobne ekspanzirati in diferencirati v več tipov celic mezodermalnega izvora, kot so osteoblasti, adipociti in hondrociti. V zadnjih letih se je pokazalo, da imajo te celice tudi sposobnost moduliranja imunskega sistema, potem ko so bile izpostavljene različnim vnetnim citokinom, kot sta TNF α in IL-1 β (2). Zaradi teh lastnosti so celice MSC zelo privlačne za uporabo v celičnih terapijah. Za doseganje največjega terapevtskega učinka pa je potrebno precejšnje število celic, za kar je potrebna ekspanzija *in vitro*. To lahko predstavlja težavo, saj se je izkazalo, da dolgotrajno gojenje celic vpliva na njihove značilnosti (3). V zadnjih letih so bili zasnovani različni avtomatizirani bioreaktorji, ki optimizirajo izolacijo in ekspanzijo celic v pogojih dobre proizvodne prakse.

Cilj našega dela je bil analizirati značilnosti mezenhimskih matičnih celic, pridobljenih iz maščobnega tkiva (AD-MSC), ki smo jih pridobili in ekspanzirali z uporabo bioreaktorja NANT001, ter na koncu oceniti primernost tega bioreaktorja za izolacijo in ekspanzijo celic.

V ta namen smo pridobili 10 vzorcev lipoaspiratov, ki smo jih uporabili za pripravo stromalne vaskularne frakcije (SVF), ki vsebuje AD-MSC. Nato smo SVF nasadili v petrijevke s površino 636 cm² in jih 14 dni inkubirali v bioreaktorju NANT001. Po tem času je bil opravljen test enote, ki tvori kolonijo (CFU), celice pa so bile odvzete za nadaljnjo ekspanzijo, delež CFU pri prehodu 1 in analizo donosa. Po ekspanziji pri p1 smo en alikvot celic uporabili za površinsko analizo markerjev s pomočjo pretočne citometrije, en alikvot pa za licenciranje AD-MSC. Za pretočno citometrijo smo CD90, CD73 in CD105 analizirali kot pozitivne markerje in CD11, CD14, CD45 in CD34 kot negativne markerje. Licenciranje AD-MSC je bilo izvedeno z inkubacijo AD-MSC s kombinacijo 1 ng/ μ l IL-1 β in 1ng/ μ l TNF α v obdobju 24 ur. Vzporedno smo izvedli kontrolni preizkus z netretiranimi celicami. Po tem času smo izolirali skupni RNK in izmerili spremembo izražanja genov, kot so IL-6, IL-1 β , CCL5, TSG6, IDO, IL-1Ra in iNOS.

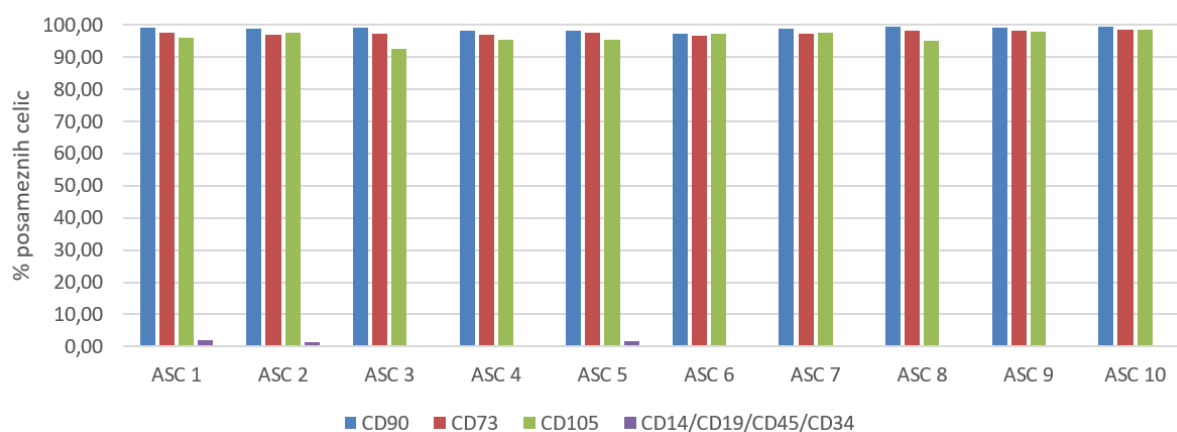
Rezultati testa CFU, opravljenega na SVF, in porabljeni AD-MSC, skupaj z donosom in povprečnimi časi ekspanzije, so prikazani v preglednici 1. Povprečni delež CFU v SVF je 0,71 %, medtem ko povprečni delež v ekspanziranih celicah znaša 12,53 %. Celice smo v povprečju ekspanzirali 8,3 dni, po tem času pa je povprečni donos znašal 39,49 milijona celic.

Preglednica 3: rezultati testa enote, ki tvori kolonijo, tako za stromalno vaskularno frakcijo, kakor tudi za mezenhimske stromalne/matične celice iz ekspaniranega maščobnega tkiva.

VZOREC	Stromalna vaskularna frakcija		Ekspanirane celice ASC			
	Število nasejanih jedrnih celic (10^6)	Delež CFU v SVF (%)	Število zasejanih CFU	Čas ekspanzije v NANT (dnevi)	Donos (10^6)	Delež CFU-F ekspaniranih celic ASC
ASC 1	31	0,99 %	307.556	7	39,10	10,90 %
ASC 2	48,8	0,10 %	46.745	8	35,70	5,50 %
ASC 3	6,8	0,41 %	27.562	11	45,80	12,60 %
ASC 4	5,2	0,37 %	19.459	10	31,60	17,50 %
ASC 5	26,3	0,35 %	91.569	8	40,20	8,50 %
ASC 6	15,05	1,65 %	247.751	7	15,69	24,08 %
ASC 7	40	0,33 %	131.697	8	32,15	12,27 %
ASC 8	30,8	1,49 %	459.369	7	50,67	7,79 %
ASC 9	21	0,46 %	97.442	9	52,44	4,06 %
ASC 10	35,1	0,91 %	319.598	8	51,56	22,06 %
POVPREČJE	26,01	0,71 %	174.875	8,3	39,49	12,53 %

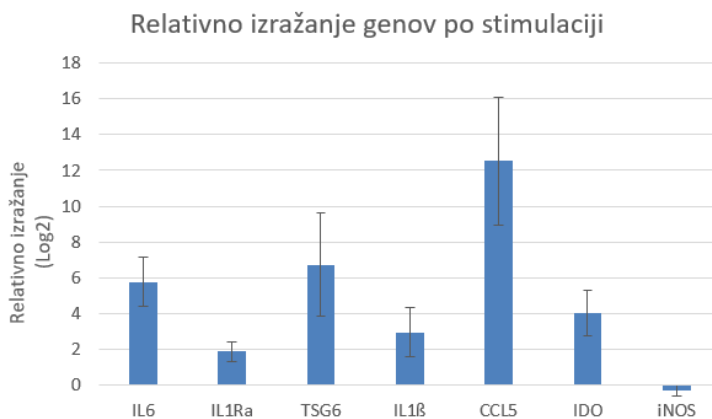
Rezultati analize pozitivnih in negativnih markerjev kažejo, da AD-MSC iz vseh vzorcev ustreza minimalnim merilom, ki jih je leta 2006 določilo Mednarodno združenje za celično terapijo. Rezultati za vsak vzorec so prikazani na sliki 1.

Izražanje površinskih markerjev AD-MSC



Slika 4: rezultati imunofenotipizacije ekspaniranega maščobnega tkiva iz mezenhimskih stromalnih/matičnih celic s pomočjo pretočne citometrije.

Z izvedbo licenciranja celic smo skušali ugotoviti, ali se lahko celice, ki so bile izolirane in ekspanirane z bioreaktorjem NANT001, odzovejo na vnetno okolje. Rezultati izražanja genov, prikazani na sliki 2, potrjujejo, da je dejansko prišlo do povečanega izražanja IL-6, IL-1Ra, TSG6, IL-1 β , CCL5 inIDO. Vendar nismo opazili nobenega povečanja izražanja iNOS.



Slika 5: rezultati analize izražanja genov po licenciranju celic

Glavne ugotovitve

Ocenili smo značilnosti celic AD-MSC, ekspandiranih v NANT001, da bi ugotovili, ali je bioreaktor NANT001 primerna možnost za ekspandiranje celic, ki se uporabljajo v celičnih terapijah. Naši rezultati kažejo, da celice AD-MSC, ekspandirane v bioreaktorju NANT001, vsebujejo velik delež CFU in dober donos po 8 dneh ekspanzije. Pokazali smo tudi, da je imunofenotip ekspandiranih celic v skladu z merili, ki jih določa ISCT. Poleg tega se te celice po stimulaciji z vnetnimi citokini aktivirajo in so sposobne vplivati na vnetje. Ti rezultati torej kažejo, da je bioreaktor NANT001 res učinkovita možnost za ekspanzijo AD-MSC.

Zahvala

Avtorja se zahvalujeta dr. Ariani Barlič in zaposlenim v podjetju Educell d.o.o. za uporabo bioreaktorja NANT001 in Luciji Ani Vrščaj z Univerze v Ljubljani, Fakulteta za farmacijo, za dragoceno pomoč.

Viri

1. Čamernik K, Mihelič A, Mihalič R, Haring G, Herman S, Marolt Presen D, et al. Comprehensive analysis of skeletal muscle- and bone-derived mesenchymal stem/stromal cells in patients with osteoarthritis and femoral neck fracture. *Stem Cell Res Ther.* 2020 Dec 3;11(1):146.
2. Čamernik K, Barlič A, Drobnič M, Marc J, Jeras M, Zupan J. Mesenchymal Stem Cells in the Musculoskeletal System: From Animal Models to Human Tissue Regeneration. *Stem Cell Rev Reports.* 2018;14(3):346–69.
3. Čamernik K, Mihelič A, Mihalič R, Marolt Presen D, Janež A, Trebše R, et al. Skeletal-muscle-derived mesenchymal stem/stromal cells from patients with osteoarthritis show superior biological properties compared to bone-derived cells. *Stem Cell Res.* 2019;38.

MIKROOKOLJE IN IMUNOMODULACIJA AMNIJSKIH MEZENHIMSKIH MATIČNIH CELIC, PRIPRAVLJENOST NA DOBRO PROIZVODNO PRAKSO V ITALIJI

Paolo Di Benedetto¹, Adriana Cifù²

1 DAME Univerza v Vidmu - Ortopedska klinika ASUFC,
Videm, Italija, paolo.dibenedetto@asufc.sanita.fvg.it

2 DAME Univerza v Vidmu - Inštitut za patologijo ASUFC,
Videm, Italija



Kot nam je že znano, so mezenhimske matične celice (MSC) multipotentne matične celice z zmožnostjo samoobnavljanja. Celična terapija temelji na sposobnosti celic MSC, da se diferencirajo in nadomeščajo poškodovane celice, ter na njihovi parakrini in imunomodulatorni aktivnosti (1). Pravzaprav topni dejavniki, ki jih sproščajo celice MSC, pomagajo obnoviti homeostazo prizadetega tkiva.

Številna klinična preskušanja so pokazala, da injiciranje celic MSC, pridobljenih iz maščob (AMSC), izboljša delovanje osteoartroznih sklepov z zaviranjem tvorbe osteofitov in zmanjšanjem razgradnje hrustanca (2). Nedavne študije so pokazale, da mehanizmi delovanja MSC potekajo preko stika med celicami in s sproščanjem topnih dejavnikov, kot so IL-10, TGFβ, PGE-2, NO inIDO, vendar natančnega mehanizma, s katerim so celice sposobne modulirati imunski odziv, še ne razumemo popolnoma.

Vemo, da so makrofagi najpomembnejše celice vnetnega odziva osteoartroze in kako uravnavajo napredovanje tega bolezenskega stanja. Da bi bolje razumeli vpliv articularnega mikrookolja na imunomodulatorne lastnosti celic MSC, smo maščobne celice MSC izpostavili sinovialni tekočini, odvzeti iz osteoartroznih sklepov, in preučevali imunomodulatorni učinek njihovega sekretoma na imunske celice, ki sodelujejo pri napredovanju bolezni: makrofagi (podobni M1 in podobni M2), dendritične celice in T-celice (3).

Celice AMSC so bile izolirane iz maščobnega tkiva, pridobljenega z lipoaspirati iz podkožne trebušne maščobe, in karakterizirane s pretočno citometrijo. Osteoartrozne sinovialne tekočine so bile odvzete iz kolena in z multipleksnim testom karakterizirane v smislu citokinov in kemokinov (preglednica 1).

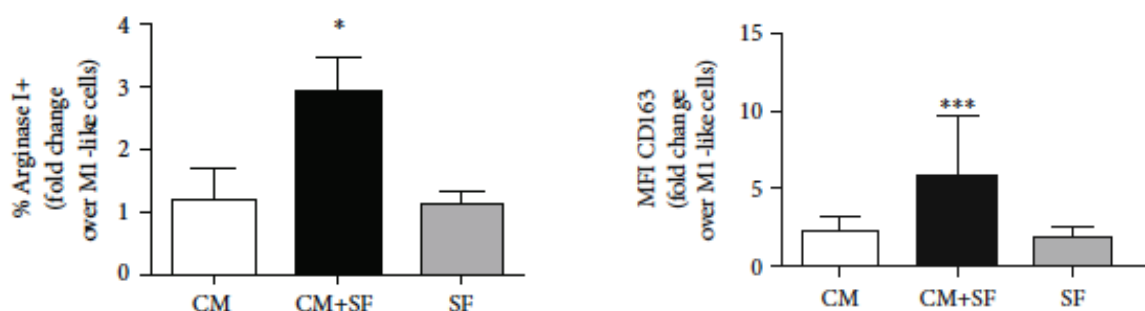
Za oceno učinka osteoartrozne sinovialne tekočine na celice MSC so bile celice vzgojene v kondicioniranem mediju, ki je vseboval 50 % sinovialne tekočine. Izpostavljenost celic sinovialni tekočini je povečala celično proliferacijo in spodbudila sproščanje citokinov in kemokinov. Proizvodnjo je povečala zlasti izpostavljenost osteoartrozni sinovialni tekočini kemokinov, kot npr. CCL21, CCL27 in CXCL15 (3).

Da bi razumeli vpliv artikularnega mikrookolja na imunomodulatorne lastnosti celic MSC po injiciranju v sklep, smo celice AMSC izpostavili sinovialni tekočini, odvzeti iz osteoartrozni sklepov, in preučevali imunomodulatorni učinek njihovega sekretoma na imunске celice, ki sodelujejo pri napredovanju bolezni: makrofagi (podobni M1 in podobni M2), dendritične celice in T-celice (3).

Preglednica 1: kemokini in citokini v osteoartrozni sinovialni tekočini (3).

Analit	pg/ml	Analit	pg/ml	Analit	pg/ml
CCL1	41.6 ± 8.8	CCL24	390.2 ± 12.7	CXCL16	925 ± 36.5
CCL2	338.3 ± 276.7	CCL25	353 ± 54.3	CX3CL1	42.1 ± 7.9
CCL3	6.8 ± 2.6	CCL26	28.9 ± 8.3	IL-1β	1.4 ± 0.5
CCL7	44.4 ± 2.7	CCL27	499.6 ± 211.2	IL-2	6.4 ± 1.5
CCL8	19.1 ± 6.7	CXCL1	87 ± 13	IL-4	15.1 ± 3.3
CCL11	20.7 ± 4.9	CXCL2	21.1 ± 5.8	IL-6	68.2 ± 31.8
CCL13	6.8 ± 1.2	CXCL5	145.5 ± 34.4	IL-10	13.5 ± 1.6
CCL15	4762.5 ± 501.3	CXCL6	6.5 ± 0.4	IL-15	506.4 ± 34.1
CCL17	12 ± 3.1	CXCL8	21.6 ± 10	IFN-γ	27.9 ± 6
CCL19	92.8 ± 19.5	CXCL9	171.2 ± 50.4	GM-CSF	38.3 ± 4.9
CCL20	5.6 ± 0.7	CXCL10	246.6 ± 51.3	MIF	7846 ± 106.5
CCL21	3333.1 ± 22.9	CXCL11	6.5 ± 1.5	TNF-α	22.6 ± 8.2
CCL22	183.3 ± 43	CXCL12	833.8 ± 58.7		
CCL23	390.2 ± 12.7	CXCL13	11.3 ± 2.3		

Zlasti za preučevanje sposobnosti sekretoma AMSC za sprožitev protivnetnega fenotipa v makrofagih, so bili monociti diferencirani v makrofagih, podobnih M1, ob prisotnosti AMSC-kondicioniranega medija nestimuliranih celic AMSC (CM) ali celic AMSC, izpostavljenih sinovialni tekočini (CM + SF), ali samo sinovialne tekočine, ugotovili pa smo, da je bilo pri celicah, podobnih M1, ki so bile obdelane s CM + SF, zaznano povečanje markerjev, podobnih M2, kot npr. Arginase I in CD163 (slika 1) (3).



Slika 1: povečano izražanje markerjev, podobnih M2 (Arginase I, CD 163), na celicah, podobnih M1, ki so bile izpostavljene kondicioniranemu mediju in sinovialni tekočini (SF) (3).

Enak preizkus smo izvedli za dendritične celice, kjer je bilo povečanje izražanja CD14 in CD123 povezano s povečanjem proizvodnje IL-10. Opazili smo tudi, kako kondicionirani medij s celicami AMSC, ki so bile izpostavljene sinovialni tekočini, zavira razmnoževanje celic CD3+ T. Hkrati so mezenhimske matične celice, izpostavljene sinovialni tekočini, znatno povečale ekspanzijo celic Treg (3).

Prejšnje študije so pokazale, da imunomodulatorne lastnosti celic AMSC niso konstitutivne, temveč se aktivirajo s signali, ki izvirajo iz vnetnega mikrookolja. Tako celice MSC, ki so pridobljene iz maščob, zahtevajo »licenciranje« s proinflammatorymi citokini, da pridobijo imunosupresivni fenotip. Na sekretom celic AMSC vplivajo medsebojne interakcije z imunskimi celicami in specifična tkivna mikrookolja, povezana z boleznijo.

Naši podatki so pokazali in potrdili prisotnost proinflammatorynih molekul v osteoartrozni sinovialni tekočini in njihov vpliv na izražanje molekul, vključenih v imunomodulacijo, s povečanim sproščanjem različnih kemokinov, ki sodelujejo pri usmerjanju različnih imunskih celic (3).

Glavne ugotovitve

V zaključku naj poudarimo, da so naši podatki pokazali, da so molekule, ki so prisotne v osteoartrozni sinovialni tekočini (TNF- α , IL-1 α , IL-1 β , IL-6, MMP-3 in MMP-9), ključne za spodbujanje matičnih celic, da izločajo imunomodulatorne dejavnike, ki zavirajo diferenciacijo dendritičnih celic, spodbujajo izločanje IL-10 (imunosupresivni dejavnik), reverzirajo diferenciacijo makrofagov M1 proti M2, zavirajo izločanje TNF- α , zmanjšujejo proliferacijo T-celic in sprožajo ekspanzijo celic T-reg. Vse to spodbuja protivnetni odziv, zato ima komunikacija z vnetnim mikrookoljem ključno vlogo pri določanju sposobnosti celic MSC za zaviranje imunskega odziva (3).

Zahvala

Ta projekt so podprli Program sodelovanja Interreg VA Italija-Slovenija, donacija Interreg ARTE (J22F170001005) in neomejena nepovratna sredstva s strani podjetja VivaBioCell S.p.A.

Viri

1. A. P. Ayala-Cuellar, J.-H. Kang, E.-B. Jeung, and K.-C. Choi, »Roles of mesenchymal stem cells in tissue regeneration and immunomodulation,« *Biomolecules & Therapeutics*, knj. 27, št. 1, str. 25–33, 2019
2. C. H. Jo, Y. G. Lee, W. H. Shin et al., »Intra-articular injection of mesenchymal stem cells for the treatment of osteoarthritis of the knee: a proof-of-concept clinical trial,« *Stem Cells*, knj. 32, št. 5, str. 1254–1266, 2014
3. Cifù A, Domenis R, Di Benedetto P, Curcio F et al. The Exposure to Osteoarthritic Synovial Fluid Enhances the Immunomodulatory Profile of Adipose Mesenchymal Stem Cell Secretome. *Stem Cells International* 2020; <https://doi.org/10.1155/2020/4058760>

POMEN PROJEKTA ARTE ZA REGIONALNI RAZVOJ

Antonio Sfiligoj, Francesco Vitrani, Flavia Mazzarol, Giacomo Cattaruzzi

VivaBioCell S.p.A., Videm, Italija, info@vivabiocell.it



Pomen farmacevtskega sektorja v Italiji in Sloveniji.

Farmacevtska industrija, ki temelji na raziskavah, lahko igra ključno vlogo pri ponovni vzpostavitvi rasti na območju Evrope ter zagotavlja prihodnjo konkurenčnost v napredujočem svetovnem gospodarstvu. Ta sektor je v Italiji še posebej pomemben tako v absolutnem kot v relativnem smislu. Ključnega pomena je tudi v Sloveniji s samo 2 milijonoma prebivalcev, na kar kažejo izjemni kazalniki pomembnosti glede na prebivalstvo (Preglednica 1).

Preglednica 4: gospodarski pomen farmacije, Italija, Slovenija, Evropa – EFPIA, 2018

	Italija	Slovenija	Evropa
Proizvodnja	30.010 milijonov EUR	1.936 milijonov EUR	248.053 milijonov EUR
Raziskave in razvoj	1.470 milijonov EUR	180 milijonov EUR	34.949 milijonov EUR
Zaposlitev	64.400	9.493	747.607

Zahvaljujoč napredkom v znanosti in tehnologiji raziskovalna farmacevtska industrija vstopa v novo vznemirljivo obdobje v razvoju zdravil. **Regenerativna medicina (RM)** je nov terapevtski pristop, ki za regeneracijo tkiv pri spopadanju s širokim spektrom onkoloških, mišično-skeletnih, kožnih in drugih bolezni uporablja žive celice. Na podlagi več kot tisoč kliničnih preskušanj se je izkazalo, da so terapije varne in učinkovite ter vodijo k izboljšanju kakovosti življenja pacientov. Tudi regenerativna medicina je hitro rastoč trg, ki bo po ocenah do leta 2025 v svetovnem merilu dosegel 50 milijard EUR. **Ključnega pomena za ta živahen sektor so nova biofarmacevtska podjetja v nastajanju, ki predstavljajo več kot 70 % raziskovalnega sistema.** Vendar, kot poudarja **nova farmacevtska strategija za Evropo** (1), RM postavlja evropski ekosistem pred pomembno razpotje:

- Zdravila za napredno zdravljenje (ATMP-ji), zlasti celične in genske terapije, so »veliki mejniki« napredka v zdravstvu.
- RM bi potrebovala nov poslovni model, da bi se lahko odzvala na preusmeritev stroškov s kroničnega na enkratno zdravljenje.
- Za industrijo je ključnega pomena močan ekosistem, ki zajema tako zagonska podjetja kot velike korporacije, od proizvajalcev patentiranih zdravil do proizvajalcev medicinskih pripomočkov in razvijalcev programske opreme.

Furlanija – Julijska krajina in Slovenija se skupaj ponašata z zelo pomembnimi prednostmi. Raziskovalne bolnišnice in univerze, številna raznolika visokotehnološka podjetja, tehnološki parki, organizacije, ki podpirajo podjetja, vlagatelji in druge zainteresirane strani v sektorju so že dejavni na

področju RM. Vendar se zavedamo, da morajo razpoložljivi klinični, poslovni in intelektualni viri sodelovati, da bi v celoti izkoristili svoj potencial za zagotavljanje terapij RM pacientom, hkrati pa ustvarjali bogastvo z nenehnimi prebojnimi inovacijami na trgu.

ARTE, projekt iskanja poti in model rasti regionalnega razvoja

Kar zadeva prebojne inovacije v regionalnem razvoju, kot je regenerativna medicina, ni ene same poti, ki bi bila najboljša. Vsaka regija ima namreč edinstven nabor priložnosti, omejitev in konkurenčnih pogojev.

Projekt ARTE Interreg V-A, Italija-Slovenija je osrednjo skupino malih in srednjih podjetij, bolnišnic in vlagateljev podprl pri sodelovanju za bolj konkurenčno in povezano območje, ki bi ponujalo tudi boljše življenje. Projektni partnerji so bili: VivaBioCell S.p.A., Videm, Italija (vodilni partner), Univerzitetna bolnišnica v Vidmu (ASUFC), Italija, Nacionalna ortopedska klinika OB Valdoltra, Ankaran, Slovenija, Fakulteta za farmacijo Univerze v Ljubljani, Slovenija, Tehnološki park Ljubljana, Slovenija in BioValley Investments, Trst, Italija.

Metodologija za gradnjo ekosistemov

Uporabljali smo model poslovnega ekosistema [2], da bi lahko vključili in podprli tehnološka podjetja, ki imajo potencial na svetovnem trgu, ter tako vzpostavili nove oblike »skupnih poslovnih modelov« za nenehne inovacije. To pomeni predvsem poslovno naravnano, odprto in dinamično pristop ter možnost aktiviranja omrežij malih in srednjih podjetij v Sloveniji, Furlaniji – Julijski krajini in Italiji ter po vsem svetu. Druge uvedene metodologije vključujejo: **odprte inovacije, diferenciacijo izdelkov (3) in nabor tehničnih tveganj (4).**

Z izboljšanjem čezmejnega sodelovanja med bolnišnicami, raziskovalnimi in razvojnimi centri, univerzami, malimi in srednjimi podjetji ter tehnološkimi parki je imel ARTE naslednje razvojne cilje:

- doseči visoko konkurenčnost na področju regenerativne medicine,
- privabiti naložbe in finančna sredstva,
- vzpodbuditi rast malih in srednjih podjetij,
- ustvariti nova delovna mesta.

OSREDOTOČENOST: projekt ARTE se je osredotočal na osteoartrozo, bolezen, ki prizadene več kot 10 % odrasle populacije in 50 % ljudi, starejših od 60 let. Na podlagi dosežkov prejšnjih projektov v okviru EU Horizon so si partnerji skupaj prizadevali, da bi regenerativna zdravila za mišično-skeletne bolezni postala cenovno dostopnejša.

Temeljna vloga podjetja VivaBioCell, »Temeljne organizacije igrajo ključno vlogo v poslovnih ekosistemih. V bistvu si prizadevajo izboljšati splošno stanje svojih ekosistemov z zagotavljanjem stabilnega in predvidljivega nabora skupnih sredstev, ki jih druge organizacije uporabljajo za izdelavo svojih ponudb. Temeljne organizacije lahko povečajo produktivnost ekosistema s poenostavitvijo zapletene naloge medsebojnega povezovanja udeležencev v omrežju ali tako, da izdelke tretjih strank naredijo učinkovitejše. Z doslednim vključevanjem tehnoloških inovacij in zagotavljanjem zanesljive referenčne točke, ki je udeležencem v pomoč pri odzivanju na nove in negotove razmere, lahko povečajo robustnost ekosistemov. Prav tako pa lahko s ponujanjem inovativne tehnologije različnim organizacijam spodbujajo ustvarjanje ekosistemskih niš«(2).

Vivabiocell je vzpostavil tudi znanstvene povezave med projektom ARTE in inštitutom REMEDI – Regenerativnim inštitutom na Nacionalni univerzi v Galwayu na Irskem, partnerjem v kliničnih preskušanjih EU Horizon ADIPOA.

Rezultati v številkah:

- 5 kliničnih raziskovalnih centrov, ki sodelujejo pri novih terapijah
- 12 javnih in zasebnih organizacij, ki se ukvarjajo z inovacijami
- 10 malih in srednjih podjetij, vključenih v izvajanje projektnih dejavnosti
- 80 vključenih zaposlenih iz podjetij ter MSP-jev
- 50 raziskovalcev (proizvodnja ATMP in klinične študije)
- 12 zagonskih podjetij; vključenost tveganega kapitala
- 3 biomedicinske inovacije prenesene na mala in srednja podjetja
- 40 malih in srednjih podjetij, ki so vključena v mreže
- 19 NOVIH ZAPOSLENIH
- PREKO 2,5 milijona EUR ZASEBNIH NALOŽB, PRIDOBLENIH OD ZASEBNIH VLAGATELJEV

Glavni rezultati:

- Medregionalno središče za regenerativno medicino zdaj že deluje
- Vzpostavljen cevovod za terapevtske aplikacije, vključno s TNBC – trojnim negativnim rakom dojk (Interreg Italija-Slovenija Projekt ImmunoCluster; LP Celica Biomed d.o.o.);
- FAC – ustanovljen konzorcij za boj proti koronavirusu (Fight Against Coronavirus), ki je v program IMI EU poslal predlog za raziskave; raziskovalna študija IND o novih zdravilih, ki jo je odobrila FDA (ZDA)

Prebojne inovacije v proizvodnji celic so se razvile okoli sistema NANT XL.

Izboljšanje proizvodnje celičnih izdelkov je osrednjega pomena za izboljšanje dostopnosti novih terapij, da lahko te pomagajo več pacientom. Avtomatizirani bioreaktorji VivaBioCell («DPP v škatli») prispevajo k izboljšanju stroškovne učinkovitosti in nadgradljivost proizvodnje.

ARTE je prispeval k razvoju naslednje generacije bioreaktorjev, ki bodo vključevali inovacije številnih malih in srednjih podjetij kot dobaviteljev. Nove rešitve vključujejo razvoj novega programskega paketa za razširitev proizvodnje in novih optičnih senzorjev.

ARTE je podjetju EDUCELL d.o.o., proizvajalcu izdelkov za celično terapijo, pomagal pridobiti strokovno znanje z orodji «DPP v škatli». Ta nova kompetenca je slovenskemu podjetju omogočila sklenitev novih zelo obetavnih mednarodnih sporazumov in pridobitev sredstev za nove naložbe.

VIZIJA SKUPNEGA SODELOVANJA V PRIHODNOSTI

Tesno sodelovanje je bistvenega pomena za zagotavljanje revolucionarnih terapij pacientom, in ustvarjanje podjetniške ter zaposlitvene rasti. Izvajanje usklajenega pristopa, opisanega na sliki 1, lahko postane osrednji eksperiment novega »vozlišča za sodelovanje na področju naprednih terapij



med Slovenijo in Italijo«, ki bi bilo za Evropo dragoceno kot preskusna točka za nove pobude v visokotehnološkem sektorju regenerativne medicine. Vozlišče bi vključevalo različne zainteresirane strani in obravnavalo tako glavno povpraševanje (npr. javne bolnišnice in uprave) kot inovativno ponudbo (izdelki, storitve, intelektualna lastnina, klinične raziskave) ter imelo doseg na ravni EU ali celo širše.

1. Regionalne klinične napotitve

- Razširitev regionalnih raziskav in razvoja (klinično; MedTech; IT)
- Sodelovanje z lokalnimi raziskovalnimi bolnišnicami
- Klinične študije faze I/II

3. Kapitalizacija strokovnega znanja

- Globalna in regionalna vozlišča
- Obravnava tehničnih in znanstvenih pomislekov
- Izkoriščanje najhitreje rastočega trga na področju zdravstva



2. Proizvodnja celičnih izdelkov

- Najsodobnejša bioproizvodnja: nižji stroški, standardizacija
- Decentralizirana, avtomatizirana proizvodnja: čim bližje pacientu
- Avtomatizirana, prenosljiva proizvodnja
- Dostop pacientov do novih terapij

4. Licenciranje partnerstev

- Licenciranje terapij
- Obravnava tehničnih in znanstvenih pomislekov
- Naložbe, rast podjetja
- Trajnostno zdravstveno varstvo in raziskave

Slika 6: ključni koraki za krepitev ekosistema RM v regiji

Glavne ugotovitve

Če povzamemo, ARTE INTERREG Italija-Slovenija VA je predhodni projekt, usklajen z novo farmacevtsko strategijo za Evropo. Pripravil je trajne spremembe v konkurenčnosti območja in ustvaril pomembno vozlišče v hitro rastočem evropskem in svetovnem ekosistemu naprednih celičnih terapij, ki koristijo pacientom, raziskavam, podjetjem, zaposlenim in gospodarstvu na splošno.

Zahvala

ARTE sta podprla tudi Centralni direktorat za zdravje avtonomne regije Furlanija – Julijska krajina in Nacionalni inštitut za javno zdravje Republike Slovenije.

Viri

1. Pharmaceutical Strategy for Europe EUROPEAN COMMISSION COM/2020/761
2. M. Iansiti in R. Levien Strategy as Ecology – The Keystone Advantage – Harvard Business Rev. 2004
3. H. Chesbrough – Open Business Models: How To Thrive In The New Innovation Landscape. Harvard Business Press. 2006
4. Gary S. Stacey, Antonio Sfiligoj - The Tech Risk Array to Integrate R&D. Battelle B-TIP. 2001

IZZIV ZA PODJETJA, DA IZBOLJŠAJO FINANCIRANJE IN SPODBUJANJE DEJAVNOSTI

Giovanni Loser

Biovalley Investments SpA, Italija, sodelujoči partner



Namen vzpostavljenega ekosistema je bil zagotoviti financiranje, čezmejno partnerstvo in mentorstvo za inovativna podjetja ter spodbuditi njihovo preobrazbo v velika in uspešna podjetja. Za to pobudo so bila izbrana štiri inovativna podjetja, od tega tri s sedežem v Sloveniji in eno v Italiji:

- Animacel d.o.o. Slovenija, terapija z matičnimi celicami za pse
- Educell d.o.o. Slovenija, terapija z matičnimi celicami
- Saving d.o.o. Slovenija, medicinska tehnologija za spremljanje srca
- Serichim s.r.l. Italija, pogodbeno raziskovalna organizacija

Ta štiri izbrana podjetja so imela različne izkušnje pri zbiranju sredstev in/ali priložnosti, da se predstavijo.

VLOGA PODJETJA BIOVALLEY INVESTMENTS

Podjetje je specializirano za trženje in prodajo izdelkov in storitev BioHighTech (BioMed, BioTech, BioICT) in naložb v inovativna podjetja, ki delujejo na bioloških, medicinskih in digitalnih trgih. V zadnjih šestih letih (2015–2020) je začelo postopek pospeševanja inkubacije ciljnih podjetij BioHighTech v regiji Furlanija – Julijska krajina z manjšinskimi semenskimi in zagonskimi kapitalskimi naložbami ter tudi z ustanovitvijo in upravljanjem mreže podjetij BioHighTech. Doslej je družba neposredno vložila več kot 4 milijone evrov s finančnim vzvodom nove vrednosti in naložb tretjih oseb za več kot 12 milijonov evrov.

EKOSISTEM FURLANIJE – JULIJSKE KRAJINE

Trst, glavno mesto Furlanije – Julijske krajine, se ponaša s številnimi univerzami, raziskovalnimi ustanovami in raziskovalci, zato je bil imenovan za evropsko prestolnico znanosti 2020 in je organiziral Evropski znanstveni forum (ESOF) 2020. Velik odstotek raziskovalcev (37 raziskovalcev na 1000 zaposlenih) se je v zadnjih 40 letih eksponentno povečal zaradi velikih naložb italijanske vlade neposredno v Trst, to obmejno mesto, ki je bilo nekoč mejilo na železno zaveso.

Visoka koncentracija raziskovalcev je omogočila rast provincialne gostote inovativnih zagonskih podjetij v Trstu, ki je najvišja v Italiji, kakor tudi pripomogla k preoblikovanju Furlanije – Julijske krajine v močno inovacijsko regijo s čezmejnimi odnosi.

KAKO SMO STRUKTURIRALI SREČANJA ZA IZVAJANJE MENTORSKEGA PROCESA?

Izbrana podjetja so morala:

- Predstaviti sebe in svoje preteklo delo
- Odgovarjati na vprašanja
- Razumeti relevantne pomisleke vlagateljev

SPLOŠNI REZULTATI TE DEJAVNOSTI

Na podlagi sestankov z izbranimi podjetji so bili z vidika kakovosti glavni rezultati naslednji:

- Odprta in ekskluzivna razprava o lastnem podjetju
- Takojšnja ocena vodstvenih sposobnosti in njihove pomanjkanja (če obstajajo)
- Veščine ustanovitelja/vodstva, poslovni model in velikost priložnosti so bili izpostavljeni kot pomembnejši (glede na razvrstitev metodologije) od izdelka/storitve
- Potreba po osredotočanju na poenostavljeno komunikacijo, jasen poslovni model in postopek ustvarjanja vrednosti
- Potrditev s strani investitorja v panogi pred morebitno izpostavljenostjo trgu financiranja
- Obravnava postopka financiranja

ZA PODJETJI JE DOLGA POT

Štiri podjetja so opravila celoten postopek mentorstva, ki je vključeval vse njihove glavne dejavnosti. Predstavljena in obravnavana metodologija jih je spodbudila, da premislijo o svoji osnovni dejavnosti in izboljšajo pripravljenost za izpolnjevanje zahtev na področju raziskovalnih in industrijskih ekosistemov. Poleg tega je zadnja dejavnost nagovora k nakupu izboljšala njihovo zmožnost interakcije s finančno skupnostjo za pridobivanje morebitnega financiranja. Biovalley Investments je postal referenčni partner za promocijo čezmejnih projektov in naložb.

ANIMACEL

Animacel je bil predstavljen italijanskemu ekosistemu za bioznanost. To je podjetju omogočilo, da se je sestalo z večnacionalno korporacijo in ponudilo svoje izdelke na ameriški trg (razprave še potekajo) ter se srečalo z inkubatorjem za bioznanost. Med predstavitvijo je podjetje izboljšalo in bolje analiziralo konkurenčni scenarij, s čimer je okrepilo svojo vrednostno ponudbo. Animacel je z inkubatorjem podpisal tudi NDA za namene financiranja in pospeševanja poslovanja.

SERICHIM

SERICHIM je bil predstavljen slovenskemu ekosistemu za bioznanost. To je podjetju omogočilo začetek čezmejnega farmacevtskega projekta z namenom, da se aktivira partnerstvo s slovensko pogodbeno raziskovalno organizacijo in da se podjetje predstavi italijanski fundaciji za bioznanost, s katero bo podpisan NDA, ki je trenutno še v postopku, za zbiranje 1,5 milijona EUR. Podjetje je imelo tudi priložnost, da se predstavi italijanskemu investicijskemu podjetju za bioznanost ter z njim podpiše NDA. Med predstavitvijo z namenom prodaje je podjetje dobilo jasno usmeritev, kako čim bolj povečati vrednost za tvegani kapital s pomočjo stranskih dejavnosti.



Ecosistema per le Terapie Avanzate di Medicina Rigenerativa

Indice:

Introduzione: di cosa si tratta? _____	53
Antonio Sfiligoj, CEO VivaBioCell, responsabile del progetto ARTE	
Medicina Rigenerativa Europea per l'osteoartrosi, fabbricazione automatizzata di ATMP con GMP _____	56
prof. dr. Frank Barry, REMEDI, Istituto di Medicina Rigenerativa di Galway (IRL)	
Cellule staminali mesenchimali per il trattamento dell'osteoartrosi: dall'idea alla realtà _____	59
prof. dr. Andrej Cör, medico, Ospedale Ortopedico Valdoltra, Slovenia	
Caratterizzazione di cellule staminali mesenchimali derivate dal tessuto adiposo ottenute con NANT001 _____	62
assist. dr. Klemen Čamernik, Facoltà di Farmacia, Università di Lubiana, Slovenia	
Microambiente e immunomodulazione di AMSC, GMP in Italia _____	65
dr. Paolo Di Benedetto, medico, Ospedale Universitario di Udine (ASUFC), Italia	
Rilevanza del progetto ARTE per lo sviluppo regionale _____	68
Antonio Sfiligoj, CEO VivaBioCell, responsabile del progetto ARTE	
Sfidare le aziende a migliorare i finanziamenti e promuovere le attività _____	72
Giovanni Loser, CEO BioValley Investments	



Introduzione: di cosa si tratta?

Antonio Sfiligoj, CEO VivaBioCell, responsabile del progetto ARTE

ARTE, un nuovo Ecosistema transfrontaliero per la Medicina Rigenerativa supportato da INTERREG, ha contribuito a stabilire l'area sloveno-italiana come hub internazionale per terapie cellulari innovative. Vari pazienti sono stati curati, sono state attivate collaborazioni per oltre 2,5 milioni di euro, creando ad oggi 20 nuovi posti di lavoro altamente qualificati.

Con uno stanziamento finanziario di oltre 90 milioni di euro per il periodo 2014-2020, Interreg V-A Italia-Slovenia è stato un programma fondamentale per promuovere l'innovazione e la cooperazione transfrontaliera per un'area più competitiva, coesa e vivibile. ARTE, per Advanced Regenerative Medicine Therapies Ecosystem (Ecosistema per le terapie avanzate di medicina rigenerativa), ha avviato collaborazioni tra Ospedali, piccole e medie imprese (PMI), investitori, istituti di ricerca e organizzazioni di supporto nel promettente nuovo campo della medicina rigenerativa - con un budget di 1.285.297 euro.

Questo nuovo approccio terapeutico applica le cellule viventi per rigenerare i tessuti per affrontare un'ampia gamma di malattie oncologiche, muscolo-scheletriche, della pelle e di altro tipo. Terapie innovative, sicure ed efficaci stanno portando a una migliore qualità della vita dei pazienti. Anche la medicina rigenerativa è un mercato in forte crescita, valutato 50 miliardi di euro entro il 2025, con oltre mille sperimentazioni cliniche in corso. Il focus iniziale di ARTE è stata l'Osteoartrite, una malattia invalidante che colpisce oltre il 10% della popolazione adulta e il 50% delle persone sopra i 60 anni.

L'area sloveno-italiana appare ben posizionata per cogliere questa opportunità, in quanto vanta ottime risorse cliniche, imprenditoriali e istituzionali. Una forte cooperazione è essenziale per portare terapie innovative ai pazienti, attrarre investimenti privati e creare crescita imprenditoriale e occupazionale.

Unendo le forze grazie ad ARTE, i Partner hanno applicato clinicamente la medicina rigenerativa all'osteoartrite del ginocchio, utilizzando prodotti cellulari fabbricati utilizzando un bioreattore automatizzato innovativo ed economico (il NANT "GMP in a Box"). Con la missione di rendere la medicina rigenerativa per le malattie muscolo-scheletriche accessibile ai pazienti, generando al contempo nuove opportunità per l'innovazione e gli investimenti delle PMI, ARTE ha raggiunto i seguenti risultati:

Una prima ricerca clinica sull'osteoartrite del ginocchio. 10 pazienti sono stati trattati presso l'Ospedale Ortopedico partner Valdoltra, Ancarano, con risultati preliminari incoraggianti. Ulteriori 10 pazienti verranno arruolati presso l'ASUFC - Ospedale Universitario partner di Udine.

Creazione di un HUB internazionale di medicina rigenerativa. ARTE ha rafforzato la collaborazione tra un nucleo di 3 centri di ricerca/ospedali e 2 reti biomediche, con oltre 450 PMI. Questo Nucleo ha

già forti associati in Italia, Irlanda, Svezia, Spagna, Israele e Stati Uniti. I ricercatori hanno pubblicato due articoli scientifici su riviste peer reviewed, mentre altri tre articoli sono in preparazione. Le prime risposte cliniche delle collaborazioni stabilite attraverso ARTE si sono dimostrate efficaci durante la pandemia di COVID-19 quando i pazienti a Udine sono stati trattati con prodotti cellulari realizzati a Lubiana. Sulla base di questa esperienza, una proposta di ricerca che coinvolge 13 partner è stata presentata al programma IMI dell'UE e uno studio sperimentale è attualmente in corso a Los Angeles. ARTE ha portato a IMMUNOCLUSTER, un nuovo progetto INTERREG SLOVENIA-ITALIA attualmente in corso per sviluppare una terapia per TNBC - Triple Negative Breast Cancer con Celica Biomed, Lubiana come leader del progetto. ARTE ha aperto la strada alla ricerca pre-clinica sull'applicabilità di prodotti cellulari autologhi per lesioni difficili (ulcere diabetiche, ustioni profonde) - finanziata dal Progetto PREFER POR-FESR Friuli Venezia Giulia.

Innovazioni rivoluzionarie nella produzione di cellule sviluppate per migliorare i costi e la scalabilità. Sei fornitori innovativi sono stati incaricati di sviluppare un software innovativo di gestione della fabbrica di cellule e sensori di imaging per migliorare la produttività e la conformità alla qualità.

Svariati vantaggi socio-economici. Durante il periodo del progetto ARTE, oltre 2,5 milioni di euro di investimenti privati nelle PMI sono stati effettuati da investitori privati, con un impatto occupazionale diretto di 18 persone altamente qualificate. Ulteriori investimenti e posti di lavoro sono previsti come follow-up per le 10 PMI presentate agli investitori. Molte altre aziende hanno partecipato a numerose mostre, workshop e altri eventi.

In sintesi, ARTE INTERREG V-A Italia-Slovenia ha innescato un cambiamento duraturo nella competitività dell'area, creando un HUB notevole nell'ecosistema mondiale in rapida crescita delle terapie cellulari avanzate a vantaggio di pazienti, ricerca, aziende, dipendenti e l'economia in generale.

PARTNER



VIVABIOCELL, Partner capofila, è un ex spin-off dell'Università degli Studi di Udine. L'azienda ha sviluppato un rivoluzionario sistema "GMP in a Box" che migliora la produzione di cellule per raggiungere un numero maggiore di pazienti.

OSPEDALE ORTOPEDICO VALDOLTRA, Ancarano, Slovenia, e **ASUFC - AZIENDA SANITARIA UNIVERSITARIA DEL FRIULI CENTRALE**, Udine, Italia, sono gli ospedali di ricerca che hanno sviluppato e implementato protocolli utilizzando cellule prodotte dal sistema "GMP in a BOX".



Il **PARCO TECNOLOGICO DI LUBIANA**, SLOVENIA, e **BIOVALLEY INVESTMENTS**, TRIESTE, Italia, sono le PMI e le organizzazioni di supporto agli investimenti che hanno coinvolto le rispettive reti di PMI, supportando gli imprenditori per presentarsi agli investitori in capitale di rischio.



University of *Ljubljana*
Faculty of *Pharmacy*

FACOLTÀ DI FARMACIA, Università di Lubiana, Slovenia, ha condotto ricerche applicate e convalide del "GMP in a Box".



REMEDI - l'Istituto di Medicina Rigenerativa di Galway (IRL), in qualità di partner esterno, ha fornito contributi scientifici, formazione e collegamento ai programmi di ricerca e innovazione dell'UE.

ARTE è stato inoltre patrocinato dalla Direzione Centrale di Salute della Regione Autonoma Friuli Venezia Giulia e dall'Istituto Nazionale di Sanità Pubblica della Repubblica di Slovenia.



TRATTAMENTI CELLULARI PER OSTEOARTROSI: RISULTATI, MECCANISMO E VALORE

Frank Barry

Remedi, Istituto di Medicina Rigenerativa, Galway, Irlanda,
www.remedi.ie



Di tutte le malattie che hanno un impatto sul sistema muscolo-scheletrico, l'osteoartrosi è di gran lunga la più diffusa, con un profondo impatto sulla qualità della vita dei pazienti, costi sociali ed economici molto significativi e il fatto che la prevalenza della malattia aumenta nelle popolazioni che stanno invecchiando. Oggi, tutti i trattamenti mirano ai sintomi piuttosto che alla causa e nessun intervento approvato impedisce la progressiva distruzione dell'articolazione, tanto meno promuove la rigenerazione. Il trattamento chirurgico invasivo e la sostituzione dell'articolazione sono quindi l'opzione prevalente in termini di frequenza della procedura e costi negli Stati Uniti e in tutto il mondo. La necessità di nuovi trattamenti è quindi molto pressante e urgente.

Le cellule stromali mesenchimali sono state in prima linea negli sforzi per sviluppare nuovi trattamenti per la malattia artritica sin dalla prima identificazione di queste cellule da parte di Alexander Friedenstein negli anni '60. Tuttavia, molti sosterranno che tale evoluzione non è ancora completa e gli standard attuali applicati per la caratterizzazione delle MSC sono piuttosto inadeguati (1,2).

Il nostro lavoro in questo campo è incentrato sulla valutazione dell'efficacia delle MSC di derivazione autologa è nel trattamento dell'osteoporosi del ginocchio. Nello studio clinico ADIPOA, finanziato nell'ambito del programma Horizon UE, abbiamo utilizzato MSC derivate da grasso autologo per il trattamento dell'osteoartrosi del ginocchio da moderata a grave. I pazienti sono stati prima sottoposti a una piccola procedura di liposuzione, in cui è stato rimosso un piccolo campione (50-60 g) di grasso, da cui è stata ottenuta una popolazione purificata di cellule MSC ed espansa in un periodo di circa due settimane. Le MSC sono state quindi inviate di nuovo in ospedale e iniettate nell'articolazione del ginocchio del paziente. Tuttavia, questo protocollo di isolamento ed espansione è un processo manuale, molto impegnativo, costoso e complicato, riconosciuto come una delle principali vulnerabilità dell'intero processo di prova e trattamento. Abbiamo quindi dedicato del tempo a questi protocolli di produzione per renderli più efficienti.

I pazienti che hanno ricevuto la cellula nell'articolazione del ginocchio hanno riportato una riduzione del dolore entro 24 ore dall'iniezione, misurata con i punteggi relativi alla sensazione di dolore VAS e questo effetto è stato mantenuto per tutta la durata dello studio (Figura 1A). Allo stesso modo, la prestazione funzionale delle ginocchia misurata dal punteggio WOMAC è aumentata entro una settimana dal trattamento ed è stata sostenuta fino a un anno durante il corso dello studio (Figura 1B). I risultati ottenuti da questo studio clinico di fase 1 hanno indicato che la procedura era sicura (non sono stati segnalati eventi avversi associati al rilascio di cellule nei pazienti) e vi erano prove

precoci di un esito positivo (3). Si noti che si trattava di uno studio non marcato, non in cieco e non controllato con placebo con un ridotto numero di pazienti, che, tuttavia, ci ha aiutato a informare un successivo studio clinico più ampio ADIPOA2, attualmente in corso - anche sotto il Programma Horizon UE.

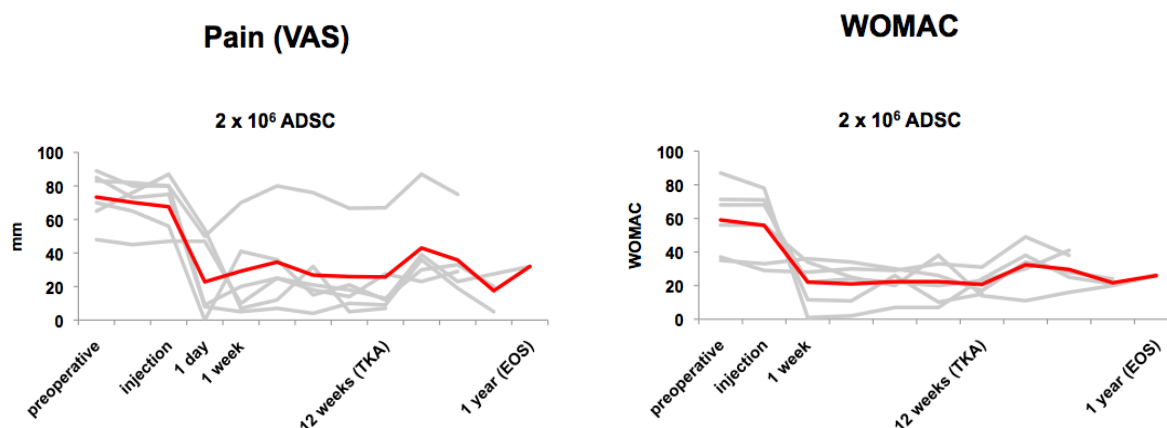


Figura 1: Risultati dello studio clinico ADIPOA. I punteggi della sensazione di dolore VAS (A) e i punteggi delle prestazioni funzionali WOMAC (B) sono stati misurati in momenti diversi dopo l'iniezione di MSC derivate da tessuto adiposo autologo. Entrambe le misurazioni hanno mostrato un miglioramento rapido e duraturo.

ADIPOA2 è uno studio clinico randomizzato in doppio cieco controllato con placebo con più di 150 pazienti affetti da osteoartrosi da lieve a moderata, svolto in dieci siti clinici in Europa con tre centri di produzione che producono le cellule. Si spera che, entro la fine di questo studio clinico nel 2021, avremo risultati statisticamente supportati, che ci diranno se questo trattamento è efficace o meno come protocollo di trattamento per l'osteoartrosi.

Esiste una grande diversità di metodi e protocolli che i ricercatori utilizzano per la preparazione di MSC per uso clinico. Questa è una delle maggiori tecnologie non standardizzate e incoerenti; esiste una grande varietà di tecniche di espansione e isolamento, fonte di tessuto utilizzata, variabili di coltura e formulazioni dei terreni, nonché il metodo di somministrazione delle MSC ottenute. Ciascuno di questi parametri ha un forte effetto sulla qualità delle MSC. Questa mancanza di standardizzazione costituisce un ostacolo importante sul campo, che influisce sulla qualità delle MSC ottenute e di conseguenza sulla coerenza e comparabilità dei risultati clinici ottenuti.

Per superare la diversità dei protocolli e altre sfide di produzione, sono state proposte soluzioni automatizzate. Abbiamo ideato il flusso di lavoro AutoStem (progetto UE Horizon) che include tutte le fasi chiave del processo di produzione, dall'aspirazione dei tessuti, all'espansione cellulare in un bioreattore, all'analisi della qualità e alla conservazione (Figura 2). Questo flusso di lavoro può essere completamente automatizzato ed essere eseguito senza alcun intervento umano in un compartimento asettico chiuso. Nella piattaforma robotica AutoStem, due bracci robotici gestiscono tutte le fasi del flusso di lavoro. Ciò consente una completa coerenza delle prestazioni per ogni fase e una sterilità garantita. Può funzionare in modo continuo, il che riduce significativamente i costi. Inoltre, diverse piattaforme possono funzionare contemporaneamente, consentendo una produzione su scala più ampia di cellule MSC per uso terapeutico. Questo prototipo è stato costruito, testato e convalidato (4).

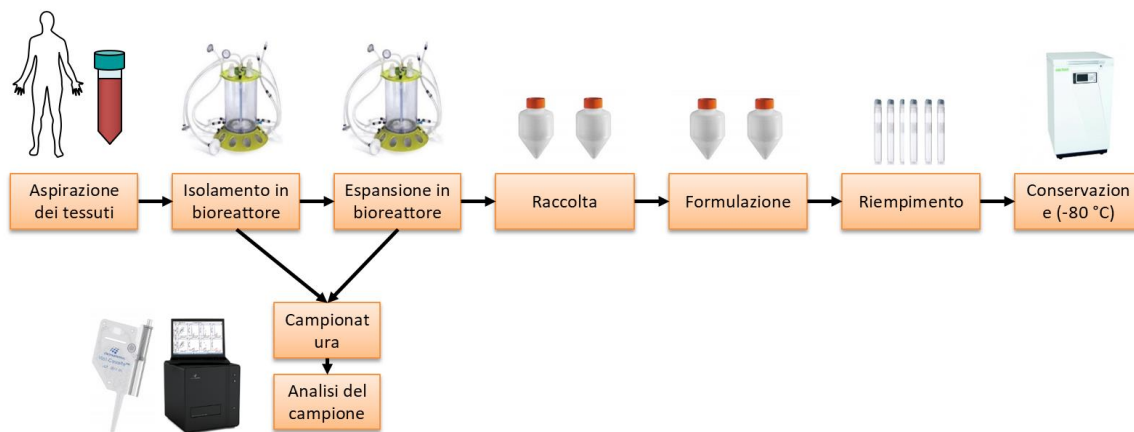


Figura 2: Rappresentazione schematica del flusso di lavoro del processo di pipeline automatizzato AutoStem per l'espansione e l'analisi delle MSC per uso clinico.

Un'altra piattaforma di espansione MSC automatizzata è NANT 001 (Figura 3), sviluppata da VivaBioCell. Questo è un bioreattore automatizzato per la produzione di lotti medio-piccoli, adatto anche all'espansione di MSC autologhe. Il NANT 001 è stato testato da REMEDI secondo rigorosi protocolli e condizioni GMP e abbiamo ottenuto un fenotipo MSC della stessa qualità ottenuta in



Figura 3: Bioreattore automatico VivaBioCell NANT 001

precedenza con i protocolli tradizionali. Inoltre, rispetto al tradizionale processo manuale, il sistema NANT 001 è più efficiente, con meno necessità di personale, funziona in modo continuativo e consente più produzioni simultanee, con maggiore produttività e costi inferiori.

Entrambe le piattaforme automatizzate proposte, AutoStem su larga scala e il più piccolo NANT 001, forniscono soluzioni ideali per una produzione migliore, più coerente, standardizzata e più sicura e potrebbero rappresentare il passo successivo verso una tecnologia di produzione migliore e standardizzata.

Riferimenti

1. Robb KP, Fitzgerald JC, Barry F, Viswanathan S. Mesenchymal stromal cell therapy: progress in manufacturing and assessments of potency. *Cytotherapy*. 2019 Mar;21(3):289–306.
2. Barry F. MSC Therapy for Osteoarthritis: An Unfinished Story. *J Orthop Res Off Publ Orthop Res Soc*. 2019 Jun;37(6):1229–35.
3. Pers Y-M, Rackwitz L, Ferreira R, Pullig O, Delfour C, Barry F, et al. Adipose Mesenchymal Stromal Cell-Based Therapy for Severe Osteoarthritis of the Knee: A Phase I Dose-Escalation Trial. *Stem Cells Transl Med*. 2016 Jul;5(7):847–56.
4. Rafiq QA, Twomey K, Kulik M, Leschke C, O’Dea J, Callens S, et al. Developing an automated robotic factory for novel stem cell therapy production. *Regen Med*. 2016 May 11;11(4):351–4.

CELLULE STAMINALI MESENCHIMALI PER IL TRATTAMENTO DELL'OSTEOARTROSI: DALL'IDEA ALLA REALTÀ

Andrej Cör

Ospedale Ortopedico Valdoltra,
Ancarano; Slovenia andrej.coer@ob-valdoltra.si



Ortopediska bolnišnica Valdoltra
Ospedale ortopedico Valdoltra

L'osteoartrosi è la forma più comune di artrosi che colpisce milioni di persone in tutto il mondo. Si stima che circa il 9,6% degli uomini e il 18% delle donne che hanno più di 60 anni soffrano di artrosi sintomatica in tutto il mondo (1). Con l'invecchiamento della popolazione mondiale, è stato previsto che oltre il 20% della popolazione soffrirà di osteoartrosi e più di 40 milioni saranno gravemente disabili entro il 2050. Le attuali strategie terapeutiche dell'osteoartrosi includono trattamenti non farmacologici, farmacologici e chirurgici con l'obiettivo primario di ridurre il dolore e migliorare la funzione e la qualità della vita. La sostituzione chirurgica dell'articolazione con protesi articolare ha rivoluzionato il trattamento dell'articolazione artritica. Nell'Ospedale Ortopedico Valdoltra vengono inserite annualmente più di 2.000 protesi articolari, tuttavia, a causa dell'allentamento della protesi, sono stati eseguiti oltre 200 interventi di revisione ogni anno per la sostituzione della protesi.

Attualmente, non esiste una terapia efficace che possa invertire la natura progressiva dell'osteoartrosi. Le cellule staminali mesenchimali (MSC) rappresentano la rivoluzione nel trattamento dell'osteoartrosi. Numerosi rapporti di studi *in vitro* e *in vivo* hanno fornito prove sulla differenziazione delle MSC in alcuni tipi di cellule come i condrociti (2). Tuttavia, due osservazioni chiave sono importanti: in primo luogo, la ritenzione di MSC iniettate nell'articolazione osteoartritica è molto bassa, tipicamente intorno al 3%, ciò indica che la maggior parte delle cellule scompare entro pochi giorni e, in secondo luogo, solo una piccola percentuale di quelle trattenute si attacca alla superficie della cartilagine (3). Sempre più prove da studi recenti suggeriscono fortemente di concentrarsi sulle proprietà paracrine delle MSC, incluso il rilascio di vescicole extracellulari contenenti molte sostanze regolatrici con effetti antinfiammatori e immunomodulatori (4).

Il nostro obiettivo nel progetto ARTE era trasferire l'idea di trattamento dell'osteoartrosi del ginocchio con MSC nella prassi clinica.

Il nostro primo compito e allo stesso tempo problema era preparare il protocollo esatto. Abbiamo trovato in letteratura più di cento studi con protocolli molto diversi in termini di criteri di inclusione ed esclusione, variabili di processo nella preparazione delle MSC e procedure di follow-up (2, 5). Abbiamo sviluppato il nostro protocollo, che ci ha permesso di richiedere alle autorità di regolamentazione tutte le approvazioni necessarie. Il nostro studio doveva essere approvato dalla Commissione Etica della Repubblica di Slovenia. Abbiamo dovuto presentare una domanda all'Agenzia per i Medicinali e i Dispositivi Medici della Repubblica di Slovenia per diventare un centro donatore di tessuto adiposo. Abbiamo dovuto registrare i medici per il trattamento con terapia avanzata. Tutto questo lavoro burocratico richiedeva tempo.

A causa dell'elevato costo della procedura di espansione cellulare, siamo stati in grado di includere nello studio solo dieci pazienti con osteoartrosi di grado 3 per il trattamento con MSC espanso. Il gruppo di controllo era costituito da dieci pazienti con osteoartrosi di grado 3, a cui è stato somministrato acido ialuronico. I pazienti idonei avevano un'età compresa tra 45 e 62 anni con osteoartrosi dell'articolazione del ginocchio di grado 3. Secondo DOSES (International Expert Consensus on a Cell Therapy Communication Tool), la nostra terapia cellulare era autologa, derivata da tessuto adiposo; cellule isolate enzimatiche e cellule espanso in coltura di laboratorio; con vitalità del 90% che esprimono CD90, CD73, CD105 e non esprimono CD45, CD19, CD11, CD34; e iniettate per via intra-articolare nel ginocchio del paziente.

I pazienti sono stati seguiti con controlli regolari a 3 e 6 mesi dall'iniezione. I nostri risultati preliminari indicano un miglioramento della valutazione del dolore rispetto al punteggio VAS di base a 3 mesi dall'iniezione delle MSC. Il punteggio VAS per il dolore al ginocchio è diminuito da 7 a 3,6 e 4,4 rispettivamente dopo 3 e 6 mesi. I pazienti nel gruppo di controllo non hanno mostrato miglioramenti significativi dopo 3 o 6 mesi. L'iniezione intra-articolare delle MSC è stata anche associata al miglioramento del punteggio WOMAC a 3 e 6 mesi dopo l'iniezione rispetto al punteggio WOMAC di base. Anche in questo caso, il punteggio WOMAC non è migliorato in modo significativo nel gruppo di controllo (Figura 1). Non abbiamo osservato eventi avversi correlati al trattamento.

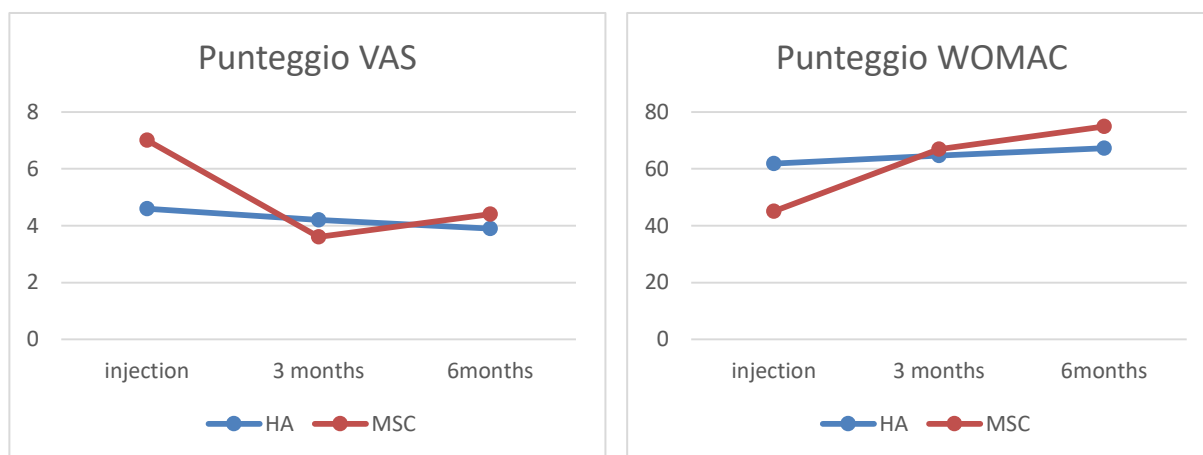


Figura 1: Variazioni del punteggio VAS per il dolore al ginocchio e del punteggio WOMAC durante 3 e 6 mesi dall'iniezione intra-articolare nel gruppo di cellule staminali mesenchimali (MSC) e acido ialuronico (HA) come gruppo di controllo.

Conclusioni generali

La medicina rigenerativa è uno dei campi più dinamici della scienza e della medicina. Negli ultimi anni sono stati compiuti progressi nell'area della terapia MSC, ma grazie al progetto ARTE sono stati fatti progressi ancora maggiori nelle nostre conoscenze sulla terapia cellulare e nelle capacità di tradurre un'idea in realtà nella prassi clinica. Questo, tuttavia, era essenzialmente lo scopo del progetto ARTE. In futuro, dovremmo lavorare mano nella mano: medici nelle cliniche che preparano protocolli di trattamento ottimali e aziende che migliorino l'isolamento e la coltivazione delle cellule e, naturalmente, le agenzie per la regolamentazione di tale trattamento. L'unica linea guida, tuttavia, deve essere il benessere dei nostri pazienti.

Riferimenti

1. Zhang Y, Jordan JM. Epidemiology of osteoarthritis. *Clin Geriatr Med* 2010;26: 355-69.
2. Barry F. MSC therapy for osteoarthritis: an unfinished story. *J Orthop Res* 2019; 37:1229-35.
3. Lukomska B, Stanaszek L, Zuba –Surma E, Legozs P, Sarazynski A, Drela K. Chalanges and controversies in human mesenchymal stem cell therapy. *Stem Cells Int* 2019; 9628536.
4. Mancuso P, Raman S, Glyn A, Barry F, Murphy. Mesenchymal stem cell therapy for osteoarthritis: The critical role of the cell secretome. *Front Bioeng Biotechnol* 2019; 7: 9.
5. Lee WS, Kim HJ, Kim KI, Kim GB, Jin W. Intra-articular injection of autologous adipose tissue-derived mesenchymal stem cells for the treatment of knee osteoarthritis: a phase IIb randomized placebo-controlled clinical trial. *Stem Cells Translat Med* 2019; 8: 504-11.

CARATTERIZZAZIONE DI CELLULE STAMINALI MESENCHIMALI DERIVATE DAL TESSUTO ADIPOSO OTTENUTE CON NANT001

Klemen Čamernik, Janja Marc

Università di Lubiana, Facoltà di Farmacia, Lubiana,
Slovenia, janja.marc@ffa.uni-lj.si



University of Ljubljana
Faculty of Pharmacy

Le cellule mesenchimali stromali/staminali (MSC) sono una popolazione eterogenea di cellule multipotenti che hanno la capacità di rigenerare i tessuti dopo un trauma e di ricostituire i tessuti usurati e le cellule senescenti (1). Una volta si pensava che fossero limitate al midollo osseo, ora sappiamo che queste cellule si trovano nella maggior parte dei tessuti adulti del corpo e possono essere facilmente isolate con diversi metodi enzimatici e non enzimatici (2). Una volta isolate, queste cellule hanno la capacità di espandersi e differenziarsi in diversi lignaggi della linea mesodermica, come osteoblasti, adipociti e condrociti. Negli ultimi anni è stato dimostrato che queste cellule hanno anche la capacità di modulare il sistema immunitario dopo essere state esposte a diverse citochine infiammatorie come TNF α e IL-1 β (2). Queste caratteristiche rendono le MSC molto interessanti per l'uso nelle terapie cellulari. Tuttavia, per ottenere il massimo effetto terapeutico, è necessario un numero considerevole di cellule che richiede espansione *in vitro*. Ciò può rappresentare un problema, poiché è stato dimostrato che la coltura prolungata delle cellule influisce sulle loro caratteristiche (3). Negli ultimi anni sono stati progettati diversi bioreattori automatizzati per ottimizzare l'isolamento e l'espansione delle cellule in condizioni GMP.

Lo scopo del nostro lavoro era analizzare le caratteristiche delle cellule staminali mesenchimali derivate dal tessuto adiposo (AD-MSC) che sono state ottenute ed espanse utilizzando il bioreattore NANT001 e valutare infine l'idoneità di questo bioreattore per l'isolamento e l'espansione cellulare. A questo scopo, abbiamo ottenuto 10 campioni di lipoaspirati che sono stati utilizzati per preparare la frazione vascolare stromale (SVF) contenente AD-MSC. La SVF è stata quindi seminata su piastre di coltura da⁶³⁶ cm² e incubata nel bioreattore NANT001 per 14 giorni. Trascorso questo periodo di tempo, è stato eseguito il test dell'unità formante colonia (CFU) e le cellule sono state raccolte per un'ulteriore espansione, proporzione di CFU al passaggio 1 e analisi della resa. Dopo l'espansione a p1, una parte di cellule è stata utilizzata per l'analisi dei marcatori di superficie mediante citometria a flusso e una parte è stata utilizzata per il licensing di AD-MSC. Per la citometria a flusso abbiamo analizzato CD90, CD73 e CD105 come marker positivi e CD11, CD14, CD45 e CD34 come marker negativi. Il licensing di AD-MSC è stato eseguito incubando le AD-MSC con una combinazione di 1 ng/ μ l di IL-1 β e 1ng/ μ l di TNF α per 24 ore. Un esperimento di controllo non trattato è stato eseguito in parallelo. Dopo tale periodo di tempo, l'RNA totale è stato isolato e sono state misurate le variazioni nell'espressione di geni come IL-6, IL-1 β , CCL5, TSG6, IDO, IL-1R α e iNOS.

I risultati del test CFU eseguito sulla SVF e le AD-MSC espanse, insieme alla resa e ai tempi medi di espansione sono riportati nella Tabella 1. La proporzione media di CFU nella SVF è dello 0,71% mentre la proporzione media nelle cellule espanse è del 12,53%. Le cellule sono state espanse per un tempo medio di 8,3 giorni, dopodiché la resa media è stata di 39,49 milioni di cellule.

Tabella 5: Risultati del test unitario formante colonie sia per la frazione vascolare stromale che per le cellule stromali/staminali mesenchimali derivate dal tessuto adiposo espanso

CAMPIONE	Frazione vascolare stromale		ASC espanse			
	Numero di cellule nucleari seminate (10 ⁶)	Proporzione di CFU nella SVF (%)	Numero di CFU seminate	Tempo di espansione in NANT (giorni)	Resa (10 ⁶)	Proporzione di CFU-F di ASC espanse
ASC 1	31	0,99 %	307.556	7	39,10	10,90%
ASC 2	48,8	0,10%	46.745	8	35,70	5,50%
ASC 3	6,8	0,41 %	27.562	11	45,80	12,60%
ASC 4	5,2	0,37%	19.459	10	31,60	17,50%
ASC 5	26,3	0,35%	91.569	8	40,20	8,50%
ASC 6	15,05	1,65%	247.751	7	15,69	24,08%
ASC 7	40	0,33%	131.697	8	32,15	12,27%
ASC8	30,8	1,49%	459.369	7	50,67	7,79%
ASC 9	21	0,46%	97.442	9	52,44	4,06%
ASC 10	35,1	0,91%	319.598	8	51,56	22,06%
MEDIA	26,01	0,71%	174.875	8,3	39,49	12,53%

I risultati dell'analisi dei marker positivi e negativi mostrano che le AD-MSC di tutti i campioni sono conformi ai criteri minimi stabiliti dalla Società Internazionale di Terapia Cellulare nel 2006. I risultati per ogni campione sono mostrati nella Figura 1.

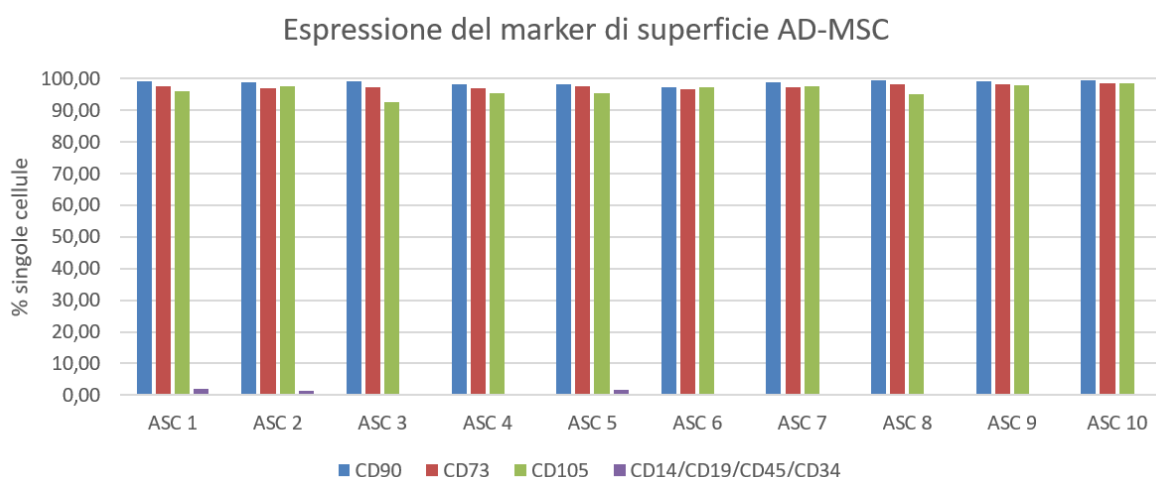


Figura 7: Risultati dell'immunofenotipizzazione di cellule stromali/staminali mesenchimali derivate dal tessuto adiposo espanso mediante citometria a flusso.

Il licensing cellulare è stato eseguito per determinare se le cellule isolate ed espanse con il bioreattore NANT001 possono rispondere a un ambiente infiammatorio. I risultati dell'espressione genica mostrati nella Figura 2 confermano che c'è effettivamente un aumento nell'espressione di IL-6, IL-1 α , TSG6, IL-1 β , CCL5 e IDO. Tuttavia, non è stato osservato alcun aumento nell'espressione di iNOS.

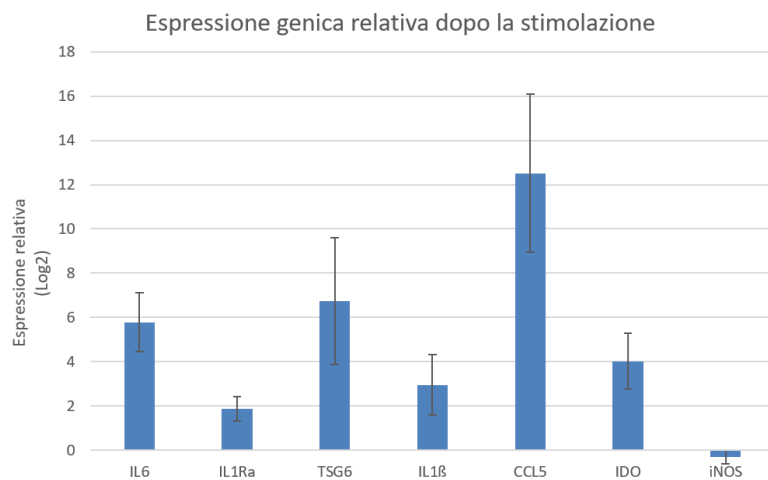


Figura 8: Risultati dell'analisi dell'espressione genica dopo il licensing cellulare

Conclusioni generali

Abbiamo valutato le caratteristiche delle AD-MSC espanse in NANT001 per determinare se il bioreattore NANT001 è un'opzione adatta per l'espansione delle cellule utilizzate nelle terapie cellulari. I nostri risultati mostrano che le AD-MSC espanse nel bioreattore NANT001 hanno un'alta percentuale di CFU e una buona resa dopo 8 giorni di espansione. Abbiamo anche dimostrato che l'immunofenotipo delle cellule espanse è conforme ai criteri stabiliti dall'ISCT. Inoltre, su stimolazione con citochine infiammatorie, queste cellule vengono attivate e hanno la capacità di modificare l'infiammazione. Questi risultati mostrano quindi che il bioreattore NANT001 è davvero un'opzione efficiente per l'espansione di AD-MSC.

Ringraziamenti

Gli autori ringraziano la dott.ssa Ariana Barlič e lo staff di Educell d.o.o. per l'uso del bioreattore NANT001 e Lucija Ana Vrščaj dell'Università di Lubiana, Facoltà di Farmacia per la sua preziosa assistenza.

Riferimenti

1. Čamernik K, Mihelič A, Mihalič R, Haring G, Herman S, Marolt Presen D, et al. Comprehensive analysis of skeletal muscle- and bone-derived mesenchymal stem/stromal cells in patients with osteoarthritis and femoral neck fracture. *Stem Cell Res Ther*, 2020;11(1):146.
2. Čamernik K, Barlič A, Drobnič M, Marc J, Jeras M, Zupan J. Mesenchymal Stem Cells in the Musculoskeletal System: From Animal Models to Human Tissue Regeneration? *Stem Cell Rev Reports*. 2018;14(3):346–69.
3. Čamernik K, Mihelič A, Mihalič R, Marolt Presen D, Janež A, Trebše R, et al. Skeletal-muscle-derived mesenchymal stem/stromal cells from patients with osteoarthritis show superior biological properties compared to bone-derived cells. *Stem Cell Res*. 2019;38.

MICROAMBIENTE E IMMUNOMODULAZIONE DI AMSC, PRONTEZZA GMP IN ITALIA

Paolo Di Benedetto¹, Adriana Cifù²

1 DAME Università degli Studi di Udine - Clinica Ortopedica
ASUFC, Udine, Italia, paolo.dibenedetto@asufc.sanita.fvg.it

2 DAME Università degli Studi di Udine - Istituto di Patologia
ASUFC, Udine, Italia



Come ben sappiamo, le cellule staminali mesenchimali (MSC) sono cellule staminali multipotenti con capacità di auto-rinnovarsi. La terapia cellulare si basa sulla capacità delle MSC di differenziare e sostituire le cellule danneggiate e sulla loro attività paracrina e immunomodulante (1). Infatti, i fattori solubili rilasciati dalle MSC aiutano a ripristinare l'omeostasi del tessuto colpito.

Diversi studi clinici hanno dimostrato che l'iniezione di MSC di derivazione adiposa (AMSC) migliora la funzione delle articolazioni osteoartrotiche inibendo la formazione di osteofiti e riducendo la degradazione della cartilagine (2). Studi recenti hanno dimostrato che il meccanismo con cui agiscono le MSC è attraverso il contatto cellula-cellula e il rilascio di fattori solubili, come IL-10, TGFβ, PGE-2, NO e IDO, ma il meccanismo preciso con cui le cellule sono in grado di modulare la risposta immunitaria non è ancora del tutto chiaro.

Sappiamo che i macrofagi sono le cellule più importanti nella risposta infiammatoria dell'osteoartrosi e come regolano la progressione di questa patologia. Quindi, per comprendere meglio l'impatto del microambiente articolare sulle proprietà immunomodulatorie delle MSC, abbiamo esposto le MSC adipose al liquido sinoviale prelevato dalle articolazioni osteoartrotiche e studiato l'effetto immunomodulatore del loro secretoma sulle cellule immunitarie coinvolte nella progressione della malattia: i macrofagi (M1-like e M2-like), cellule dendritiche e cellule T (3).

Le AMSC sono state isolate dal tessuto adiposo ottenuto dai lipoaspirati dal grasso addominale sottocutaneo e caratterizzate mediante citometria a flusso. I liquidi sinoviali osteoartrotici sono stati raccolti dal ginocchio e caratterizzati in termini di citochine e chemochine mediante dosaggio multiplex (Tabella 1).

Per valutare l'effetto del liquido sinoviale osteoartrotico sulle MSC, le cellule sono state coltivate in mezzo condizionato contenente il 50% di liquido sinoviale. L'esposizione delle cellule al liquido sinoviale ha aumentato la proliferazione cellulare e ha promosso il rilascio di citochine e chemochine. In particolare, l'esposizione al liquido sinoviale osteoartrotico ha sovraregolato la produzione di chemochine come CCL21, CCL27 e CXCL15 (3).

Per comprendere meglio l'impatto del microambiente articolare sulle proprietà immunomodulatorie delle MSC dopo l'iniezione nell'articolazione, abbiamo esposto le AMSC al liquido sinoviale prelevato

dalle articolazioni osteoartritiche e studiato l'effetto immunomodulatore del loro secretoma sulle cellule immunitarie coinvolte nella progressione della malattia: i macrofagi (simili a M1 e simili a M2), cellule dendritiche e cellule T (3).

Tabella 1: Chemochine e citochine nel liquido sinoviale osteoartritico (3).

Analita	pg/ml	Analita	pg/ml	Analita	pg/ml
CCL1	41.6 ± 8.8	CCL24	390.2 ± 12.7	CXCL16	925 ± 36.5
CCL2	338.3 ± 276.7	CCL25	353 ± 54.3	CX3CL1	42.1 ± 7.9
CCL3	6.8 ± 2.6	CCL26	28.9 ± 8.3	IL-1β	1.4 ± 0.5
CCL7	44.4 ± 2.7	CCL27	499.6 ± 211.2	IL-2	6.4 ± 1.5
CCL8	19.1 ± 6.7	CXCL1	87 ± 13	IL-4	15.1 ± 3.3
CCL11	20.7 ± 4.9	CXCL2	21.1 ± 5.8	IL-6	68.2 ± 31.8
CCL13	6.8 ± 1.2	CXCL5	145.5 ± 34.4	IL-10	13.5 ± 1.6
CCL15	4762.5 ± 501.3	CXCL6	6.5 ± 0.4	IL-15	506.4 ± 34.1
CCL17	12 ± 3.1	CXCL8	21.6 ± 10	IFN-γ	27.9 ± 6
CCL19	92.8 ± 19.5	CXCL9	171.2 ± 50.4	GM-CSF	38.3 ± 4.9
CCL20	5.6 ± 0.7	CXCL10	246.6 ± 51.3	MIF	7846 ± 106.5
CCL21	3333.1 ± 22.9	CXCL11	6.5 ± 1.5	TNF-α	22.6 ± 8.2
CCL22	183.3 ± 43	CXCL12	833.8 ± 58.7		
CCL23	390.2 ± 12.7	CXCL13	11.3 ± 2.3		

In particolare, per studiare la capacità del secretoma delle AMSC di indurre un fenotipo antinfiammatorio nei macrofagi, i monociti sono stati differenziati in macrofagi simili a M1 in presenza di mezzo condizionato AMSC di AMSC non stimolate (CM) o AMSC esposte al liquido sinoviale (CM + SF) o solo liquido sinoviale e abbiamo scoperto che le cellule simili a M1 trattate con CM + SF hanno mostrato un aumento dei marcatori simili a M2 come Arginasi I e CD163 (Figura 1) (3).

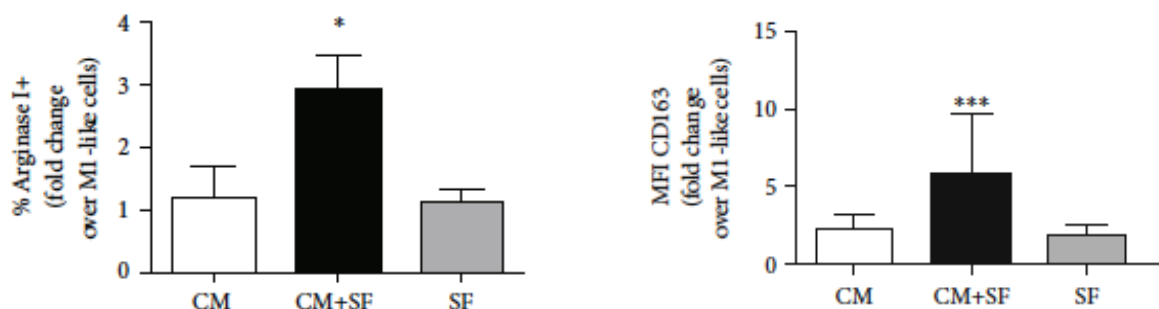


Figura 1: Aumento dell'espressione di marcatori simili a M2 (Arginasi I, CD 163) su cellule simili a M1 esposte a mezzo condizionato più liquido sinoviale (SF) (3).

Lo stesso esperimento è stato eseguito per le cellule dendritiche e c'è stato un aumento dell'espressione di CD14 e CD123 associato all'aumento della produzione di IL-10. Abbiamo anche notato come il mezzo condizionato delle AMSC esposte al liquido sinoviale inibisca la proliferazione delle cellule T CD3 +. Allo stesso tempo, le cellule staminali mesenchimali esposte al liquido sinoviale hanno aumentato significativamente l'espansione di Treg (3).

Precedenti studi hanno dimostrato che le proprietà immunomodulatorie delle AMSC non sono costitutive, ma piuttosto attivate da segnali derivati da un microambiente proinfiammatorio. Quindi, le MSC di derivazione adiposa richiedono "licensing" da parte di citochine proinfiammatorie per acquisire un fenotipo immunosoppressivo. Il secretoma delle AMSC è influenzato dalla reciproca interazione con le cellule immunitarie ed è influenzato da specifici microambienti tissutali correlati alla malattia.

I nostri dati hanno dimostrato e confermato la presenza di molecole proinfiammatorie nel liquido sinoviale osteoartritico e che queste influenzano l'espressione delle molecole coinvolte nell'immunomodulazione attraverso la sovraregolazione del rilascio di diverse chemochine coinvolte nell'homing di varie cellule immunitarie (3).

Conclusioni generali

In conclusione, i nostri dati suggeriscono che le molecole presenti nel liquido sinoviale osteoartritico (TNF- α , IL-1 α , IL-1 β , IL-6, MMP-3 e MMP-9) sono essenziali per indurre le cellule staminali a secernere fattori immunomodulatori che inibiscono la differenziazione delle cellule dendritiche, promuovono la secrezione di IL-10 (fattore immunosoppressore), invertono la differenziazione dei macrofagi M1 verso M2, inibiscono la secrezione di TNF- α , riducono la proliferazione delle cellule T e inducono l'espansione delle cellule T-reg. Tutti questi favoriscono la risposta antinfiammatoria, per questo la comunicazione con il microambiente infiammatorio gioca un ruolo essenziale nel determinare la capacità delle MSC di sopprimere la risposta immunitaria (3).

Ringraziamenti

Questo progetto è stato sostenuto dal Programma di Cooperazione Interreg V-A Italia-Slovenia Grant Interreg ARTE (J22F170001005) e con il finanziamento illimitato di VivaBioCell SpA.

Riferimenti

1. A. P. Ayala-Cuellar, J.-H. Kang, E.-B. Jeung, and K.-C. Choi, "Roles of mesenchymal stem cells in tissue regeneration and immunomodulation," *Biomolecules & Therapeutics*, vol. 27, no. 1, pp. 25–33, 2019
2. C. H. Jo, Y. G. Lee, W. H. Shin et al., "Intra-articular injection of mesenchymal stem cells for the treatment of osteoarthritis of the knee: a proof-of-concept clinical trial," *Stem Cells*, vol. 32, no. 5, pp. 1254–1266, 2014
3. Cifù A, Domenis R, Di Benedetto P, Curcio F et al. The Exposure to Osteoarthritic Synovial Fluid Enhances the Immunomodulatory Profile of Adipose Mesenchymal Stem Cell Secretome. *Stem Cells International* 2020; <https://doi.org/10.1155/2020/4058760>

RILEVANZA DEL PROGETTO ARTE PER LO SVILUPPO REGIONALE

Antonio Sfiligoj, Francesco Vitrani, Flavia Mazzarol, Giacomo Cattaruzzi

VivaBioCell S.p.A., Udine, Italia, info@vivabiocell.it



La rilevanza del settore farmaceutico in Italia e Slovenia.

L'industria farmaceutica basata sulla ricerca può svolgere un ruolo fondamentale nel riportare l'Europa alla crescita e garantire la futura competitività in un'economia globale che avanza. Il settore è particolarmente importante in Italia sia in termini assoluti che relativi. È cruciale anche in Slovenia, con una popolazione di soli 2 milioni di abitanti, come indicato dagli eccezionali indicatori di rilevanza su base pro capite (Tabella 1).

Tabella 6: Rilevanza economica del settore farmaceutico, Italia, Slovenia, Europa - EFPIA, 2018

	Italia	Slovenia	Europa
Produzione	30.010 milioni di euro	1.936 milioni di euro	248.053 milioni di euro
R&S	1.470 milioni di euro	180 milioni di euro	34.949 milioni di euro
Occupazione	64.400	9.493	747.607

Grazie ai progressi della scienza e della tecnologia, l'industria farmaceutica basata sulla ricerca sta entrando in una nuova entusiasmante era nello sviluppo dei farmaci. **La Medicina Rigenerativa (RM)** è un nuovo approccio terapeutico che usa le cellule viventi per rigenerare i tessuti per trattare un'ampia gamma di malattie oncologiche, muscoloscheletriche, della pelle e di altro tipo. Con oltre mille studi clinici in corso, le terapie si dimostrano sicure ed efficaci e stanno portando a una migliore qualità della vita dei pazienti. La medicina rigenerativa è anche un mercato in rapida crescita, valutato 50 miliardi di euro in tutto il mondo entro il 2025. Le **nuove aziende biofarmaceutiche emergenti, che rappresentano oltre il 70% della pipeline di ricerca, sono vitali per questo vivace settore.** Tuttavia, come evidenziato dalla **nuova strategia farmaceutica per l'Europa (1)**, RM pone l'ecosistema europeo di fronte a un importante crocevia:

- I Prodotti Medicinali per Terapie Avanzate (ATMP), in particolare le terapie geniche e cellulari, sono "pietre miliari" del progresso sanitario.
- RM richiederebbe un nuovo modello di business per affrontare il passaggio nei costi dal trattamento cronico a quello occasionale.
- Un ecosistema solido è fondamentale per l'industria, che dalle start-up alle grandi aziende, dai produttori di medicinali brevettati ai produttori di dispositivi medici agli sviluppatori di software.

Insieme, Friuli Venezia Giulia e Slovenia hanno i punti di forza essenziali. Ospedali e università di ricerca, diverse società high-tech diversificate, parchi tecnologici, organizzazioni di supporto alle

imprese, investitori e altri stakeholder del settore sono già attivi in prima linea in RM. Tuttavia, c'è la consapevolezza che le risorse cliniche, aziendali e intellettuali disponibili devono collaborare per soddisfare il loro pieno potenziale per portare terapie RM ai pazienti, creando ricchezza attraverso continue innovazioni rivoluzionarie introdotte sul mercato.

ARTE, un progetto di ricerca e modello di crescita dello sviluppo regionale

Non esiste un percorso migliore per lo sviluppo regionale per quanto riguarda le innovazioni rivoluzionarie, come la medicina rigenerativa. Ogni regione è soggetta a una serie unica di opportunità, vincoli e condizioni competitive.

Il progetto Interreg V-A, Italia-Slovenia ARTE, ha supportato un nucleo di PMI, ospedali e investitori a collaborare per un'area più competitiva, coesa e vivibile. I Partner del progetto sono: VivaBioCell S.p.A., Udine, Italia (Capofila), Ospedale Universitario di Udine (ASUFC), Italia, Clinica Ortopedica Nazionale Ospedale Ortopedico Valdoltra, Ancarano, Slovenia, Facoltà di Farmacia dell'Università di Lubiana, Slovenia, Parco Tecnologico di Lubiana, Slovenia e BioValley Investments, Trieste, Italia.

Metodologia di costruzione dell'ecosistema

Il modello Business Ecosystem (2) è stato perseguito per coinvolgere e supportare le aziende tecnologiche che hanno un potenziale di mercato globale, mettendo in atto nuove forme di "modelli di business collaborativi" per l'innovazione continua. Ciò implica soprattutto un approccio orientato al business, aperto e dinamico e la capacità di attivare reti di PMI in Slovenia, Friuli Venezia Giulia e Italia, oltre che a livello globale. Altre metodologie implementate includono: **Open Innovation**, **Product Platforming** (3) e **Tech Risk Array** (4).

Migliorando la cooperazione transfrontaliera tra strutture ospedaliere, centri di ricerca e sviluppo, università, PMI e parchi tecnologici, ARTE ha avuto i seguenti obiettivi di sviluppo:

- raggiungere un'elevata competitività nel campo della medicina rigenerativa,
- attrarre investimenti e risorse finanziarie,
- crescita primaria delle PMI,
- generare nuova occupazione.

FOCUS: Il focus iniziale di ARTE è stata l'Osteoartrosi, una malattia invalidante che colpisce oltre il 10% della popolazione adulta e il 50% delle persone sopra i 60 anni. Basandosi sui risultati dei precedenti progetti Horizon dell'UE, i Partner hanno lavorato insieme per rendere accessibile la medicina rigenerativa per le malattie muscolo-scheletriche.

Il ruolo Keystone di VivaBioCell: "Le organizzazioni Keystone svolgono un ruolo cruciale negli ecosistemi aziendali. Fondamentalmente, mirano a migliorare la salute generale dei loro ecosistemi fornendo un insieme stabile e prevedibile di risorse comuni che altre organizzazioni utilizzano per costruire le loro offerte. Le pietre miliari di volta possono aumentare la produttività dell'ecosistema semplificando il complesso compito di connettere tra loro i partecipanti alla rete o creare nuovi prodotti di terze parti più efficienti. Possono migliorare la robustezza dell'ecosistema incorporando costantemente innovazioni tecnologiche e fornendo un punto di riferimento affidabile che aiuta i partecipanti a rispondere a condizioni nuove e incerte. E possono incoraggiare la creazione di nicchie dell'ecosistema offrendo tecnologie innovative a una serie di organizzazioni terze"(2).

VivaBioCell ha anche stabilito collegamenti scientifici tra ARTE e REMEDI - Istituto di Medicina Rigenerativa all'Università Nazionale di Galway, un Partner nelle sperimentazioni cliniche UE Horizon ADIPOA.

Risultati in cifre:

- 5 centri di ricerca clinica che collaborano a nuove terapie
- 12 organizzazioni pubbliche e private coinvolte nell'innovazione
- 10 PMI coinvolte nell'attuazione delle attività del progetto
- 80 dipendenti di aziende e PMI coinvolte
- 50 ricercatori (produzione ATMP e studi clinici)
- 12 start-up; coinvolgimento del capitale di rischio
- 3 innovazioni biomediche trasferite alle PMI
- 40 PMI appartenenti a reti
- 19 NUOVI DIPENDENTI
- OLTRE 2,5 MILIONI DI € INVESTIMENTI PRIVATI DA INVESTITORI PRIVATI

Risultati generali:

- L'Hub Interregionale di Medicina Rigenerativa è ora operativo
- Stabilita una pipeline di applicazioni terapeutiche, tra cui TNBC - Triple Negative Breast Cancer (Progetto Interreg Italia-Slovenia ImmunoCluster; LP Celica Biomed d.o.o.);
- Costituzione del consorzio FAC - Fight Against Coronavirus, che presenta una Proposta di Ricerca al Programma IMI EU; IND Investigational New Drug study approvato dalla FDA (USA)

Innovazioni rivoluzionarie nella produzione di celle sviluppate attorno al sistema NANT XL.

Il miglioramento della produzione di prodotti cellulari è fondamentale per l'accessibilità economica di nuove terapie, consentendo a più pazienti di beneficiare di nuove soluzioni. I bioreattori automatizzati di VivaBioCell ("GMP-in-a-Box") contribuiscono a migliorare i costi e la scalabilità della produzione.

ARTE ha contribuito allo sviluppo della famiglia di bioreattori di prossima generazione che incorporerà le innovazioni di diversi fornitori di PMI. Le nuove soluzioni includono lo sviluppo di una nuova suite software per scalare la produzione e nuovi sensori ottici.

In particolare, ARTE ha aiutato EDUCCELL d.o.o., che realizza prodotti per la terapia cellulare, ad acquisire esperienza con gli strumenti "GMP in a Box". Questa nuova competenza ha consentito alla PMI slovena di concludere nuovi accordi internazionali molto promettenti e di ottenere finanziamenti per nuovi investimenti.

LA VISIONE PER CONTINUARE A LAVORARE, INSIEME

Una forte cooperazione è essenziale per portare terapie innovative ai pazienti e creare crescita imprenditoriale e occupazionale. L'implementazione dell'approccio congiunto delineato nella Figura 1 potrebbe diventare l'esperimento centrale di un nuovo "Hub di Terapie Avanzate Collaborativo



Slovenia-Italia", che avrebbe un valore europeo significativo come banco di prova per nuove iniziative nel settore high-tech della Medicina Rigenerativa. L'Hub comprenderebbe varie parti interessate e soddisferebbe sia la domanda principale (ad esempio, ospedali pubblici e amministrazioni), che l'offerta innovativa (prodotti, servizi, proprietà intellettuale, ricerca clinica) e avrebbe una portata UE/internazionale.



Figura 9: Passaggi chiave per rafforzare l'ecosistema RM nella regione

Conclusioni generali

In sintesi, ARTE INTERREG V-A Italia-Slovenia è stato un progetto precursore allineato alla nuova Strategia Farmaceutica per l'Europa. Ha innescato un cambiamento duraturo nella competitività dell'area, creando un notevole HUB nell'ecosistema europeo e globale in rapida crescita per le terapie cellulari avanzate, a vantaggio di pazienti, ricerca, aziende, dipendenti e dell'economia in generale.

Ringraziamenti

ARTE è stato inoltre patrocinato dalla Direzione Centrale di Salute della Regione Autonoma Friuli Venezia Giulia e dall'Istituto Nazionale di Sanità Pubblica della Repubblica di Slovenia.

Riferimenti

1. Pharmaceutical Strategy for Europe EUROPEAN COMMISSION COM/2020/761
2. M. Iansiti and R. Levien Strategy as Ecology – The Keystone Advantage – Harvard Business Rev. 2004
3. H. Chesbrough - Open Business Models: How To Thrive In The New Innovation Landscape. Harvard Business Press. 2006
4. Gary S. Stacey, Antonio Sfiligoj - The Tech Risk Array to Integrate R&D. Battelle B-TIP. 2001

SFIDARE LE AZIENDE A MIGLIORARE I FINANZIAMENTI E PROMUOVERE LE ATTIVITÀ

Giovanni Loser

Biovalley Investments SpA, collaboratore



Lo scopo dell'ecosistema consolidato era fornire finanziamenti, partenariati transfrontalieri e tutoraggio per le aziende innovative e alimentare la loro trasformazione in imprese di grandi dimensioni e di successo. Per questa iniziativa sono state selezionate quattro aziende innovative, tre delle quali con sede in Slovenia e una in Italia:

- Animacel d.o.o. Slovenia, Terapia con cellule staminali per cani
- Educell d.o.o. Slovenia, Terapia con cellule staminali
- Saving d.o.o. Slovenia, Medtech per il monitoraggio del cuore
- Serichim s.r.l. Italia, Organizzazione di ricerca a contratto

Nel tempo, queste quattro aziende selezionate hanno avuto diversi tipi di esperienze nella raccolta di fondi e/o opportunità di presentarsi.

IL RUOLO DEGLI INVESTIMENTI BIOVALLEY

Il Family Office è specializzato nel marketing e nella vendita di prodotti e servizi BioHighTech (BioMed, BioTech, BioICT) e investimenti in aziende innovative che operano nei mercati delle scienze della vita, della medicina e del digitale. Negli ultimi sei anni (2015-2020) ha avviato il processo di accelerazione dell'incubazione delle aziende target BioHighTech nella regione Friuli Venezia Giulia con investimenti di capitale in seed e startup di minoranza, nonché con la costituzione e gestione di una rete di aziende BioHighTech. Finora l'Azienda ha investito direttamente più di 4 milioni di euro facendo leva su nuovo valore e investimenti di terzi per oltre 12 milioni di euro.

L'ECOSISTEMA FVG

Trieste, capoluogo della regione Friuli Venezia Giulia, ha un numero elevato di università, istituti di ricerca e ricercatori e per questo è stata nominata Capitale Europea della Scienza 2020 e ha organizzato l'European Science Forum (ESOF) 2020. L'elevata densità di ricercatori (37 ricercatori ogni 1000 dipendenti) è cresciuta in modo esponenziale negli ultimi 40 anni, grazie ai grandi investimenti provenienti direttamente dal governo italiano a Trieste, questa città di confine, che un tempo si trovava al confine della Cortina di Ferro.

L'elevata concentrazione di ricercatori ha sia consentito la crescita di una densità provinciale di startup innovative a Trieste, che è la più alta in Italia, sia ha contribuito a trasformare il Friuli Venezia Giulia in una regione forte e innovatrice con rapporti transfrontalieri.

COME ABBIAMO STRUTTURATO GLI INCONTRI PER ESEGUIRE IL PROCESSO DI TUTORAGGIO?

Le aziende selezionate dovevano:

- Presentare se stesse e il proprio lavoro passato
- Seguire un processo di domande e risposte
- Comprendere le informazioni rilevanti per gli investitori

RISULTATO COMPLESSIVO DI QUESTA ATTIVITÀ

Sulla base degli incontri tenuti con le Aziende selezionate, i principali risultati dal punto di vista qualitativo sono stati i seguenti:

- Discussione aperta ed esclusiva sulla propria azienda
- Valutazione immediata sulle capacità di gestione e mancanza delle stesse (ove presenti)
- Fondatore/competenze gestionali/modello di business e dimensione dell'opportunità sono stati finalmente percepiti in modo più rilevanti (secondo la classificazione della metodologia) rispetto al prodotto/servizio
- Necessità di concentrarsi su una comunicazione semplificata, un modello di business chiaro e un processo di generazione di valore
- Convalida da parte di un investitore del settore prima di ogni possibile esposizione al mercato dei finanziamenti
- Affrontare il processo di finanziamento

È STATO UN LUNGO VIAGGIO

Le quattro aziende sono state sottoposte a un completo processo di tutoraggio che ha coinvolto tutte le loro principali attività. La metodologia presentata e discussa li ha messi nelle condizioni di rivedere il proprio core business e di migliorare la disponibilità a incontrare l'ecosistema della ricerca e dell'industria. Inoltre l'attività di lancio finale ha migliorato le capacità di interagire per attività di finanziamento con la comunità finanziaria. Biovalley Investments diventa un partner di riferimento per promuovere progetti e investimenti transfrontalieri.

ANIMACEL

Animacel è stata introdotta nell'ecosistema italiano delle scienze della vita. Questo ha dato all'azienda l'opportunità di incontrare una Multinazionale per offrire i suoi prodotti da introdurre sul mercato statunitense (discussioni ancora in sospeso) e di incontrare un incubatore di scienze della vita. Durante la sessione di lancio, l'azienda ha migliorato e analizzato meglio lo scenario competitivo rafforzando la propria proposta di valore. Animacel ha anche firmato un accordo di riservatezza a scopo di finanziamento e accelerazione del business con l'Incubatore.

SERICHIM

SERICHIM è stata introdotta nell'ecosistema sloveno delle scienze della vita. Ciò ha dato l'opportunità all'azienda di avviare un progetto farmaceutico transfrontaliero con l'obiettivo di attivare una partnership con un'organizzazione di ricerca su contratto slovena e di un lancio per una fondazione di scienze della vita italiana firmando un accordo di riservatezza con l'obiettivo, ancora in corso, di raccogliere 1,5 milioni di euro. L'azienda ha anche avuto l'opportunità di lancio per un investitore di capitale di rischio italiano di scienze della vita firmando un accordo di riservatezza. Durante la sessione di lancio, ha ricevuto una chiara direzione su come massimizzare il valore per un investitore di capitale di rischio attraverso un'attività di spin-off.

Interreg

ITALIA-SLOVENIJA



ARTE



UNIONE EUROPEA
EVROPSKA UNIJA