

RELAZIONE DI GESTIONE SCIENTIFICA FONDAZIONE M. TETTAMANTI 2019-2020

Direttore Scientifico: Prof. Andrea Biondi

A. Progetti di ricerca

1. Caratterizzazione e drug targeting di sottogruppi di leucemia acuta linfoblastica pediatrica ad alto rischio (Dr. G. Cazzaniga)

Il progetto ha l'obiettivo di caratterizzare gli eventi patogenetici di specifici sottogruppi di LAL pediatrica, associati ad un alto rischio di recidiva della malattia, al fine di trovare nuovi farmaci specifici per una terapia mirata personalizzata. In particolare:

Task1.1. Pazienti con LAL associata a Sindrome di Down

I bambini con sindrome di Down (DS) hanno un aumentato rischio di sviluppare la leucemia linfoblastica acuta (DS-LAL). La leucemia, in particolare la DS-LAL, è la loro terza causa di morte dopo le malattie cardiache congenite e le infezioni respiratorie. Questa elevata mortalità è dovuta sia ad una alta tossicità correlata alla chemioterapia che ad una resistenza intrinseca alla terapia. E' perciò impellente lo sviluppo di strategie terapeutiche su misura. Recentemente sono state descritte due alterazioni genetiche della LAL associate a prognosi sfavorevole.

Scopo dello studio è stato valutare l'incidenza e il valore prognostico delle caratteristiche Ph-like e Ikaros-plus in 134 bambini con DS-LAL trattati nei protocolli AIEOP-BFM in centri italiani (AIEOP) e tedeschi (BFM) dal 2000 al 2011.

In prospettiva, verrà eseguito uno screening esteso ed automatizzato di farmaci già in uso clinico per diverse patologie, per identificare potenziali molecole sulle quali estendere studi in vitro ed in vivo con lo scopo di introdurli nella pratica clinica in associazione a schemi ridotti di chemioterapia (*collaborazione con Prof. Borkhardt, Dusseldorf, Germania*)

Task 1.2. Targeting specifico di aberrazioni del gene PAX5 nel contesto del profilo di espressione genica Ph-like

Il sottotipo LAL Ph-like comprende il 10-15% dei pazienti con BCP-LAL, predice un'elevata incidenza di recidive e definisce un sottogruppo candidato per un trattamento farmacologico mirato.

Obiettivi: (i) identificare casi BCP-LAL Ph-like in pazienti trattati nei Protocolli di Studio dell'Associazione Italiana di Ematologia e Oncologia Pediatrica (AIEOP); (ii) valutare la loro prognosi; e (iii) caratterizzare le loro basi genetiche.

Task1.3. Studio preclinico di efficacia di un nuovo inibitore chinasi per il trattamento della LAL pediatrica con riarrangiamenti di JAK2

A differenza delle fusioni ABL-class, i casi con alterazione del segnale cellulare JAK/STAT, che rappresentano il 7% del sottogruppo "Ph-like", sono stati meno esplorati. Il gene JAK2 codifica per una tirosin chinasi non recettoriale fondamentale per l'ematopoiesi, regolando molteplici vie di segnalazione intracellulare. Le mutazioni JAK2 sono state ampiamente studiate nella leucemia e nel linfoma, mentre i geni di fusione

JAK2 sono ancora scarsamente caratterizzati. Utilizzando tecnologia NGS abbiamo identificato 10 casi portatori di fusioni di JAK2 in una coorte di pazienti pediatriche BCP-LAL ad alto rischio per PCR MRD. Scopo generale del progetto è quello di valutare l'efficacia della combinazione del trattamento TKI con agenti chemioterapici standard potrebbe permettere di mantenere l'efficacia riducendo l'intensità e la relativa tossicità della chemioterapia.

Task 1.4. Ruolo del gene MSI2 nella leucemia linfoblastica acuta infant con riarrangiamento del gene MLL

L'identificazione di nuovi geni coinvolti nella LAL infant con riarrangiamento di MLL (MLLr) è di grande interesse, per meglio chiarire il meccanismo molecolare alla base della patologia e possibilmente identificare nuove strategie terapeutiche. Musashi-2 (MSI2) è una proteina che si lega a mRNA target e regola la loro traduzione in proteine. MSI2 svolge un ruolo cruciale nel mantenimento di HSC normali regolando la divisione cellulare simmetrica/asimmetrica. Inoltre, MSI2 è sovraespresso in tumori, compresa la leucemia, dove è coinvolto nella proliferazione cellulare, differenziazione e mantenimento del pool di cellule staminali.

Scopo generale del progetto è studiare il ruolo di MSI2 in LAL infant MLLr sottotipo di leucemia ancora gravato da una prognosi molto sfavorevole.

2. Caratterizzazione della fase pre-leucemica della LAL del bambino (Dr. G. Cazzaniga)

Da molti anni ci occupiamo dello studio della LAL caratterizzata da traslocazione t(12;21), un'alterazione genetica associata al gene di fusione *TEL-AML1*, che spesso colpisce il bambino prima della nascita, durante il suo sviluppo nell'utero materno e costituisce l'evento iniziale necessario, ma insufficiente, per la manifestazione della leucemia. Per avere la comparsa clinica della malattia sono infatti necessarie ulteriori mutazioni che possono insorgere nel bambino da pochi mesi fino anche a 15 anni dopo la nascita. Il periodo di tempo tra la prima mutazione e quelle successive viene chiamato "fase pre-leucemica".

Scopo complessivo del progetto è comprendere come il gene di fusione *TEL-AML1* possa dare vantaggi selettivi alla cellula che la predispongono all'insorgenza della leucemia.

Task 2.1. Meccanismi di supporto alla cellula pre-leucemica positiva per ETV6/RUNX1(E/R) nella nicchia del midollo osseo

Le cellule pre-leucemiche E/R mostrano una maggiore suscettibilità alla trasformazione a seguito di ulteriori insulti genetici, che innescano lo sviluppo di leucemia nell'1% dei casi E/R. Si ritiene che una risposta immunitaria e infiammatoria disregolate a infezioni comuni sia il principale attore nella trasformazione maligna E/R+, che porta all'acquisizione di mutazioni secondarie. In collaborazione con la Prof.ssa Laura Russo (Dipartimento di Chimica Bioorganica, Unimib) stiamo sviluppando un modello 3D (mediante 3D bio printing) al fine di valutare il contributo di ciascuna popolazione e della matrice extracellulare nel sostenere sopravvivenza delle cellule pre-leucemiche in condizioni infiammatorie e normali. Inoltre, intendiamo isolare e coltivare cellule B da un modello murino transgenico *TEL-AML1* generato dai nostri collaboratori (Prof. M. Greaves, London, UK) come modello alternativo di cellule che esprimono E/R+ per studi 3D, 2D e in vivo.

Scopo dello studio è chiarire il ruolo del microambiente midollare e dell'infiammazione nel promuovere la sopravvivenza e la progressione delle cellule pre-leucemiche E/R verso la manifestazione clinica della malattia.

Task 2. 2. Senescenza indotta da oncogene nella pre-leucemia ETV6/RUNX1 positiva: ruolo e possibile targeting

L'espressione E/R nelle cellule pro-B (BaF3) causa il rallentamento della progressione del ciclo cellulare, caratteristica del fenotipo di senescenza indotta da oncogene (OIS). Inoltre, le cellule pre-leucemiche E/R+ pro-B (BaF3) hanno una robusta attivazione della segnalazione di arresto del ciclo cellulare dipendente da p53, mentre l'apoptosi dipendente da p53 è disattivata. La chemioterapia è inefficace contro le cellule pre-leucemiche, che possono sopravvivere e fornire un serbatoio cellulare per la ricaduta.

Scopo del lavoro è comprendere il ruolo dei meccanismi di senescenza (in particolare il ruolo di OIS) nella fase pre-leucemica e trovare bersagli candidati, che potrebbero istruire su come eradicarli dall'organismo per prevenire lo sviluppo della leucemia e la sua ricaduta.

Il progetto si avvale di numerose collaborazioni nazionali e internazionali: *Prof.ssa L. Russo, Dip. di Chimica Bioorganica, Unimib* per studiare gli effetti delle cellule pre-leucemiche sul microambiente ; *Prof.ssa D. Besozzi, Informatica, Unimib* per lo sviluppo di un modello computazionale di pre-leucemia E/R+, utilizzando metodologia *fuzzy logic* per prevedere il comportamento delle cellule pre-leucemiche dopo perturbazione del sistema mediante l'introduzione di stimoli appropriati (es. danno al DNA); *Dr. I. Sanchez-Garcia, Salamanca, Spain* per la validazione di in un modello murino pre-leucemico E/R+ in vivo (SCA1-E/R) e la capacità del gene di fusione di indurre OIS.

3. Predisposizione genetica a LAL pediatrica (Dr. G. Cazzaniga)

E' sempre più evidente che la LAL pediatrica ha un'origine multifattoriale, in cui fattori esogeni giocano un ruolo insieme alla suscettibilità genetica individuale. È stato dimostrato che alcune condizioni genetiche ben note predispongano allo sviluppo di LAL. Inoltre, studi recenti hanno descritto pazienti con LAL non sindromica con una variante genetica in geni associati ad alto rischio di sviluppare leucemia, quali PAX5, ETV6, IKZF1 e altri. Inoltre, studi di associazione genomica (GWAS) hanno evidenziato varianti genetiche germinali in geni (ARID5B, CEBPE, GATA3) costantemente associati ad un rischio ridotto di sviluppare leucemia.

Task 3.1 Identificazioni di varianti germinali predisponenti a LAL

Lo scopo complessivo del progetto è (i) individuare sindromi note associate a LAL, (ii) identificare nuove condizioni predisponenti LAL.

A. Analisi retrospettiva di casi sindromici da cartelle cliniche AIEOP e prospettica di predisposizione a leucemia nel protocollo AIEOP-BFM ALL2017.

B. Costituzione di un board panel multidisciplinare di esperti (Genetista di laboratorio, Genetista clinico, Ematologi Pediatri, Tecnici di laboratorio) che prenda in carico le diverse richieste di analisi di casi con

sospetto di alterazione genetica/predisposizione, decidano la conduzione del caso, con eventuale indicazione alla consulenza genetica pre-test, la decisione sul test genetico da eseguire, la sua esecuzione, e la consulenza post-test. I primi contesti identificati sono le leucemie e le immunodeficienze (vedi progetto 4), a seguire le altre malattie ematologiche.

C. Analisi di varianti genetiche in una coorte prospettica di pazienti LAL.

Abbiamo analizzato 150 casi consecutivi di pazienti all'esordio di LAL pediatrica ed arruolati al protocollo AIEOP 2009 e 130 casi di ricadute, tramite un pannello NGS di 40 geni, selezionati dalla letteratura. E' in corso la valutazione dettagliata delle diverse varianti identificate. E' inoltre in corso il sequenziamento WES del DNA di remissione di malattia di 100 casi pediatrici che hanno sviluppato LAL (*collaborazione con Prof.M.Capasso, Napoli*), per identificare varianti germline associate all'insorgenza della malattia.

D. Analisi delle varianti di TP53 in LAL ipodiploide pediatrica.

La LAL ipodiploide è frequentemente associata a varianti di TP53, la maggior parte delle quali sono germline, suggerendo che la LAL ipodiploide possa essere una manifestazione della sindrome di Li-Fraumeni (LFS). Abbiamo eseguito l'analisi NGS di un pannello mirato di 40 geni, tra cui TP53, in una serie retrospettiva di pazienti italiani LAL ipodiploidi pediatrici arruolati in quattro protocolli di prima linea a livello nazionale. Abbiamo dimostrato l'elevata prevalenza di varianti germinali di TP53 nella LLA ipodiploide, confermando così che la LLA ipodiploide è una possibile manifestazione della LFS. Questa evidenza evidenzia l'importanza della consulenza genetica e dello screening TP53 per i pazienti e le famiglie ipodiploidi p53.

E. Mutazioni nei geni delle coesine e ruolo nella predisposizione genetica alla LAL pediatrica

La sindrome di Cornelia de Lange (CdLS) è causata da varianti germinali nei geni delle coesine, che sono coinvolti in uno spettro di disturbi dello sviluppo, noti come "coesinopatie". Mutazioni somatiche sono state descritte nelle neoplasie mieloidi e nei tumori solidi. Recentemente, abbiamo descritto il primo caso di LAL in un paziente CdLS, con una nuova mutazione in NIPBL (*Fazio G, et al. J Clin Pathol. 2019*).

Lo studio procede per estendere l'identificazione delle varianti dei geni delle coesine in pazienti LAL, per analizzare il loro potenziale ruolo nella leucemogenesi.

4. Analisi di alterazioni genetiche in pazienti pediatrici con immunodeficienze (Dr.G. Cazzaniga)

Recentemente, la competenza genetica e di biologia cellulare e molecolare del laboratorio è stata messa a disposizione per la caratterizzazione di pazienti con immunodeficienza con sospetto di base genetica (*collaborazione con Dr. F.Saettini, della Clinica Pediatrica*)

Abbiamo contribuito alla caratterizzazione di tre nuovi pazienti, da famiglie non imparentate, con agammaglobulinemia, infezioni ricorrenti e cardiomiopatia ipertrofica. Due di loro presentavano anche neutropenia cronica intermittente o grave. Abbiamo identificato varianti omozigoti o eterozigoti composte nel gene *Folliculin interacting protein 1* (FNIP1), con conseguente perdita della proteina. Il metabolismo delle cellule B, inclusi i numeri e l'attività mitocondriale e la via PI3K / AKT, ne risultava compromessa.

In un paziente con Familial hemophagocytic lymphohistiocytosis di tipo 2 (FHL2) è stata identificata la variante p.K285Sfs 4 in omozigoti, associata ad esito molto precoce e fatale. Tale variante causa l'arresto

prematura della proteina perforina (PRF1), responsabile del difetto presinaptico. La FHL è una malattia della prima infanzia e l'effetto delle varianti sulla struttura proteica è correlato all'esordio precoce della malattia. L'ampio spettro fenotipico di FHL2 nell'uomo indica la necessità cruciale di testare la patogenicità di ogni nuova variante PRF1 individuata.

Abbiamo descritto due fratelli con nuove varianti del gene ADA2, espandendo lo spettro mutazionale del deficit di ADA2 e dimostrando che la linfoproliferazione, la persistenza di grandi linfociti granulari, le perturbazioni dei linfociti T e l'attivazione della via PI3K, misurate mediante livelli di fosforilazione di S6, sono rilevabili in pazienti ADA2 senza leucemia T-LGL.

L'Unità di Genetica della Leucemia Pediatrica, diretta dal Dr. Cazzaniga è composta da 3 Post Doc (M. Bardini, G. Fazio, C. Palmi), 6 PhD student (C. Saitta, L. Bettini, M. Bertagna, M. Quadri, L. Valsecchi, D. Acunzo), 1 PhD student Marie Curie Program (A. Oikonomou), 1 Bioinformatico (A. Grioni, fino al 31/08/2020), 1 assegnista di ricerca, Pediatra, Ematologa (M. D'Angiò), 1 Specializzanda Pediatria (S. Nucera, 2020), 2 studenti di Biotecnologie mediche. Si avvale inoltre del supporto di personale prevalentemente dedicato alla diagnostica molecolare e citogenetica (tecnici di laboratorio e biotecnologi).

5. Studio della nicchia della leucemia linfoblastica acuta a precursori B (BCP-ALL) (Dr.ssa G.D'Amico)

L'Unità della Dr.ssa G. D'Amico (Ricercatrice della Fondazione Tettamanti) è focalizzata all'identificazione dei segnali derivati dallo stroma che guidano il mantenimento e l'evoluzione della leucemia al fine di scoprire nuovi meccanismi molecolari che potrebbero essere bersagli terapeutici. Un focus specifico è dato ad ActivinA, un modulatore chiave del mantenimento e dell'aggressività della leucemia. In particolare, il progetto dell'unità comprende quattro linee di ricerca:

Studiare i meccanismi di promozione della leucemia da parte di ActivinA, analizzando:

- A. *Ruolo potenziale di ActivinA sulla vescicolazione cellulare di BCP-ALL, in termini di concentrazione e contenuto delle vescicole extracellulari (EV) di acidi nucleici e proteine. In particolare abbiamo scoperto che la linea leucemica 697 sono in grado di produrre entrambe le popolazioni di EV, ma l'aggiunta di Activin A aumenta significativamente il rilascio di vescicole.*

Recentemente, un notevole interesse nel campo dei tumori si è concentrato sul ruolo delle EV presenti nel microambiente nel regolare la resistenza ai farmaci delle cellule leucemiche. Abbiamo quindi analizzato il potenziale effetto chemioprotettivo delle EV indotte dal trattamento con Activin A. A questo scopo, abbiamo utilizzato l'Asparaginasi che è un farmaco antileucemico utilizzato negli attuali protocolli di BCP-ALL. In primo luogo, abbiamo eseguito test di chemioresistenza sulle cellule per valutare l'effetto dell'ActivinA e abbiamo dimostrato che la molecola è in grado di diminuire la sensibilità delle cellule leucemiche all'apoptosi indotta dai farmaci. *ii) la capacità di ActivinA di promuovere l'ingresso delle cellule leucemiche nel CNS in modelli in vitro ed in vivo delle cellule leucemiche stimolate con ActivinA e di alterare il microambiente cerebrale utilizzando co-culture di fettine organotipiche con le cellule leucemiche (in collaborazione con la Dott.ssa Zanier, Istituto Mario Negri) ed analisi di espressione, genica, proteica e microscopia confocale.*

B. Cambiamenti metabolici all'interno della nicchia leucemica.

I meccanismi alla base della protezione metabolica delle cellule leucemiche da parte delle cellule mesenchimali stromali (MSC) vengono analizzati mediante lo studio dei geni coinvolti nella sintesi e nel trasporto della glutammina e dell'asparagina, l'identificazione delle vie metaboliche proleucemiche, mediante un approccio metabolomico e di caratterizzazione degli effetti di ActivinA sul metabolismo delle MSC e delle cellule leucemiche. In particolare (*in collaborazione con il Prof. O. Bussolati, Università di Parma*), abbiamo dimostrato che Le MSC del midollo osseo secernono l'asparagina (Asn) e proteggono la cellula leucemica di BCP-ALL dal trattamento con L-asparaginasi (ASNase).

A. Combinare le terapie anti-leucemiche con il targeting del microambiente, utilizzando un farmaco "trappola" di ActivinA.

A tal fine utilizzeremo l'orologio murino (RAP-011) del farmaco Sotatercept, che oggi viene utilizzato in clinica per il trattamento di diverse malattie non oncologiche. Abbiamo sottoscritto un accordo con la multinazionale Celgene (USA) per utilizzare RAP-011 nel contesto della terapia anti-leucemia, come unico centro al mondo. La capacità del RAP-011 di eradicare la BCP-ALL sarà testata *in vitro* ed *in vivo* in combinazione con due diversi approcci anti-leucemici, la chemioterapia standard e le cellule CARCIK-CD19, attualmente utilizzato nel nostro centro.

B. Studio della componente macrofagica pro-tumorale nella nicchia leucemica

La BCP-ALL riprogramma lo stroma del midollo osseo circostante (BM) per creare nicchie di supporto alla leucemia. Per chiarire il contributo delle cellule immunitarie al microambiente leucemico, ci proponiamo di studiare il coinvolgimento dei compartimenti del monocito e del macrofago nella patologia del BCP-ALL. Le analisi immunoistochimiche hanno mostrato che i macrofagi CD68-positivi sono notevolmente aumentati nelle biopsie del BM di pazienti leucemici, rispetto ai controlli. Molto importante, tali cellule esprimono prevalentemente i marcatori dei macrofagi M2 pro-tumorali, CD163 e CD206. Inoltre, è stata osservata una polarizzazione sbilanciata dei monociti nel sangue periferico dei pazienti BCP-ALL, dove è stato osservato un aumento significativo di monociti "non classici" e "intermedi", che esprimono alti livelli di CD163 (*in collaborazione con il gruppo del Prof. Mantovani- Humanitas University, Milano*).

6. Studio dell'asse Chemerina/Chem R23 in vivo in un modello murino di GVHD acuta (Dr.ssa G.D'Amico)

Il trapianto allogenico di cellule staminali ematopoietiche (HSCT) è diventato il trattamento di scelta per numerosi disordini ematopoietici, tumori solidi, errori congeniti del metabolismo ed immunodeficienze primitive. Purtroppo, la sua ampia applicazione è limitata dall'insorgenza di diverse complicazioni, tra cui la malattia del trapianto verso l'ospite (GVHD) che rappresenta ancora oggi la prima causa di morte a seguito dell'HSCT.

Lo scopo generale del progetto è quello di comprendere il potenziale ruolo della chemerina in un modello murino di GVHD acuta (*in collaborazione con il Prof. S. Sozzani dell'Università La Sapienza di Roma*). A partire dall'osservazione che in un modello murino di GVHD, si rilevano livelli elevati di chemerina con l'insorgenza della GVHD e per tutta la durata della malattia è stata indagata il suo coinvolgimento nella patogenesi della

GVHD. I risultati ottenuti sono di estremo interesse, infatti mostrano che i topi trapiantati con cellule ottenute da topi KO sviluppano una malattia significativamente più severa rispetto a topi trapiantati con cellule ottenute da topi wild type. Inoltre l'analisi citofluorimetrica dell'infiltrato leucocitario ha mostrato un aumento del numero di neutrofili nel colon di topi tChemR23^{-/-} rispetto ai topi tWT. Tale aumento è associato ad una significativa riduzione dell'infiltrato macrofagico nei tChemR23^{-/-}. Studi futuri saranno necessari per comprendere se i macrofagi richiamati possano intervenire nella protezione e rigenerazione dell'epitelio intestinale.

7. Caratterizzazione delle cellule staminali mesenchimali (MSC) ottenute dai pazienti con sindrome Schwachman-Diamond (Dr.ssa G. D'Amico)

L'Unità di ricerca della Dr.ssa D'Amico ha da molti anni sviluppato un filone di ricerca sulla malattia di "Schwachman-Diamond" (SDS), Si tratta di una malattia rara ereditaria caratterizzata da insufficienza del pancreas esocrino e da alterazioni ematologiche legate a disfunzione midollare, caratterizzata principalmente da una neutropenia costante o intermittente, meno frequentemente da una piastrinopenia e un'anemia; più raramente sono presenti mielodisplasia e leucemia.

Tale attività di ricerca è risultata strategica per il riconoscimento delle attività della Clinica Pediatrica in "EuroBloodNet", uno degli "European Reference Network-ERN", network promosso da EU per promuovere il network tra i Centri di Eccellenza in Europa sulla malattie rare.

Le attività di ricerca si sono focalizzate su due progetti:

- A. Caratterizzazione del difetto funzionale e molecolare delle cellule mesenchimali nei pazienti con SDS (SDS-MSC) che non sono in grado di ricreare una nicchia ematopoietica normale, con proprietà angiogeniche compromesse in risposta a stimoli angiogenici suggerendo che tale difetto potrebbe svolgere un ruolo fondamentale nel difetto vascolare, e nella neutropenia dei pazienti affetti da SDS.
- B. Analisi in vitro delle proprietà di un farmaco grado di "saltare" le mutazioni stop codon che sono presenti nella maggior parte dei pazienti SDS ed inducono la formazione della proteina non funzionante (*in collaborazione con il Dr. M. Cipolli dell'Università di Ancona*)

In studi su linee ematopoietiche e non ematopoietiche (MNC da midollo osseo, linee linfocitarie immortalizzate e cellule mesenchimali stromali) la proteina viene prodotta nella forma integra e in un saggio funzionale di produzione in vitro delle colonie di precursori emopoietici (G-CFU) risulta funzionale.

L'Unità della Dr.ssa D'Amico è costituita da una Post-doc (Erica Dander), da 5 PhD Student (Giulia Cricri, Gloria Bedini, Alessandra Fallati, Noemi di Marzo, Clarissa Gervasoni), e da una studenti di Biotecnologie (Rita Starace).

8. **I recettori chimerici (CAR T), ovvero le cellule come farmaci: quando l'ingegneria genetica aiuta il sistema immunitario a combattere le leucemie (Coordinatore dei progetti CART: Prof. Andrea Biondi)**

La ricerca sui CART rappresenta uno degli "asset" più importanti delle ricerche della FT. Anche se il primo annuncio dell'efficacia dei CART nel trattamento di una bambina con LLA refrattaria a molteplici linee di trattamento, risale al 2012 quando Prof. K.June lo ha comunicato, al Congresso dell'ASH di Atalanta (a cui ha fatto seguito la pubblicazione sul New Engl J Med nell'aprile del 2013), l'investimento sulle terapie avanzate (cellulari e geniche) da parte della FT data molto prima. Tappa essenziale di tale sviluppo è stata la realizzazione del Laboratorio di Terapia Cellulare e Genica (autorizzato dall'AIFA nel 2007) realizzato dal Comitato ML Verga e Comitato S.Verri, e il cui personale è totalmente a carico della FT. Il primo successo di terapie avanzate cellulari è dovuto all'attività di ricerca della Dr.sa D'Amico con lo sviluppo di un protocollo di terapia cellulare per il trattamento della GVHD resistente ad ogni trattamento in collaborazione con i Colleghi dell'Ematologia dell'Ospedale Papa Giovanni 23 di Bergamo (Unità diretta dal Prof. A. Rambaldi). La storia dei CART al Centro Tettamanti inizia il ritorno del Dr.E.Biagi dopo un periodo intenso e proficuo presso il Baylor College di Houston, USA. Nel 2006 il Dr.E.Biagi insieme ad altri ricercatori europei, di ritorno dagli Stati Uniti, scrive un progetto accolto e finanziato dalla CE e con un titolo davvero significativo per la storia futura: "Childhope". Purtroppo tale progetto, pioniere in quegli anni, non vide alcuna applicazione, almeno in Italia per le problematiche di complessità autorizzativa del protocollo.

Da allora, sempre sotto la guida del Prof. E.Biagi fino al 2017 (quando ha lasciato il suo incarico presso la Clinica Pediatrica e FT, per rivestire un ruolo importante in una delle Aziende Farmaceutiche leader nel campo dei CART), ha sviluppato a con il suo team (Dr.ssa Magnani C. e Dr.ssa Tettamanti S.) numerosi CART che almeno nei modelli preclinici di diversi tipi di leucemia (LLA, Leucemia Mieloide Acuta e Leucemia Linfatica Cronica) hanno dimostrato una straordinaria efficacia e che hanno rappresentato le basi per lo sviluppo ed il successo negli anni successivi.

Nel 2015, anno in cui ci siamo proposti di portare in sperimentazione clinica un prodotto interamente sviluppato dalla FT(CARCIKCD19) di cui è stato depositato un brevetto e attualmente attivo, inizia la collaborazione con Formula, azienda Biotech con sede in USA, con la quale mediante un Research Sponsored Agreement (RSA) otteniamo i finanziamenti per lo sviluppo clinico del prodotto CARCIKCD19. Il prodotto era originale per diversi aspetti rispetto a quello che successivamente (2018) ha ottenuto l'approvazione da parte di EMA ed FDA. Ma è stata certamente la conferma dei risultati dello studio di Fase 1/2 avvenuta in queste settimane (Ottobre, 2020) che si è avuta conferma di tale originalità.

Nel 2019 si è realizzato il merging tra Formula e Colmune (USA), azienda Biotech con una notevole esperienza di ricerca, produzione e sviluppo nel campo delle terapie innovative cellulari e geniche in oncologia, con cui è iniziata una importante collaborazione scientifica di R&D con la FT.

Attualmente sono diversi i progetti che prevedono ricerca e sviluppo (preclinico e clinico) nelle diverse Unità di Ricerca della FT, in particolare quelle della Dr.sa Serafini (in cui si è collocata come project leader la Dr.ssa Tettamanti S.) e del Dr. Gaipa G. (in cui si è collocata come project leader la Dr.ssa Magnani C.). Ma anche nell'Unità della Dr.ssa G.D'Amico, una nuova recentissima linea di ricerca prevede proprio l'utilizzo dei CARCIKCD19 e molecole che interferiscono con target del microambiente midollare.

Al fine di rendere più integrato lo sforzo delle diverse Unità di Ricerca, il Prof. Biondi si è assunto l'incarico di un coordinamento dei diversi progetti sui CART, che consente altresì di sviluppare al meglio il rapporto di R&D con Colmune.

9. Strategie terapeutiche con cellule CAR-CIK per colpire le cellule staminali leucemiche localizzate nella nicchia midollare della leucemia mieloide acuta (Dr.ssa M.Serafini)

9.1 Sviluppo e validazione preclinica di un CAR diretto contro il CD33 per il trattamento della LMA resistente (CARCIKCD33)

Lo studio delle Dr.sse Rotiroti M.C. e Tettamanti S., hanno portato alla finalizzazione di dati pre-clinici sull'efficacia di CARCIKCD33, un nuovo prodotto interamente sviluppato dalla FT. I dati ottenuti e di recente pubblicazione costituiscono il background necessario per la preparazione dell'*Investigational Medical Product Dossier* (IMPD) che deve accompagnare la proposta di studio clinico all'AIFA per procedere alla sua sperimentazione.

9.2 Sviluppo di un costruito CAR "bi-specifico" per eradicare le cellule staminali leucemiche presenti nel midollo osseo dei pazienti LMA

Nel tradurre la terapia con cellule CAR-CIK nel contesto della LMA, un importante problema è rappresentato dalla mancanza di un antigene bersaglio appropriato, che sia espresso selettivamente solo sulle cellule LMA. Gli antigeni CD33 e CD123, anche se non sono espressi esclusivamente su cellule LMA, sono tra i più validati. CD123, noto anche come recettore alfa dell'IL3, e CD33 sono stati trovati co-espressi fino al 70% dei pazienti con LMA e sovra-espressi sulle cellule staminali leucemiche, che sono cellule resistenti alla chemioterapia e che sembrano maggiormente coinvolte nella recidiva della malattia. Pertanto, un approccio di successo per il trattamento della LMA dovrebbe focalizzarsi sulla eradicazione selettiva delle cellule staminali leucemiche. Il nostro gruppo ha sviluppato cellule CAR-CIK reindirizzate ai singoli antigeni CD123 e CD33 mostrando una potente e specifica attività anti-leucemica in vitro e in vivo contro linee cellulari e blasti primari di LMA. Al fine di migliorare la selettività verso le cellule staminali leucemiche e, allo stesso tempo, ridurre la tossicità, la nostra unità sta sviluppando cellule CAR "bi-specifiche", che vadano a colpire con efficacia le cellule staminali leucemiche che co-esprimono gli antigeni CD123 e CD33, ma evitando l'effetto tossico, definito "off-target", su tessuti normali, come cellule staminali ematopoietiche e cellule endoteliali sane.

9.3 Sviluppo di cellule CAR-CIK, ingegnerizzate per co-esprimere CXCR4 e CD33.CAR, con aumentata capacità di migrazione e attività antileucemica nella LMA

Nuovi studi hanno identificato una serie di fattori, coinvolti nell'interazione tra la nicchia e le cellule leucemiche, che potrebbero essere bersagliati o sfruttati a nostro vantaggio per lo sviluppo di nuovi approcci terapeutici. Tra questi, l'asse chemochinico CXCL12-CXCR4 sembra essere di particolare interesse nella LMA. Il nostro gruppo di ricerca ha formulato l'idea di sfruttare l'asse chemochinico CXCL12-CXCR4 per migliorare le capacità migratorie delle cellule CAR all'interno del midollo e favorire l'eradicazione della leucemia. Nello specifico, abbiamo disegnato un costruito bicistronico composto sia da un CAR di terza generazione diretto contro la molecola CD33, un antigene espresso dalla maggior parte dei blasti LMA, sia dal recettore CXCR4. In sostanza, ipotizziamo che mimando lo stesso meccanismo adoperato dai blasti, le cellule CIK che over-esprimono CXCR4, possano migliorare la loro capacità migratoria nel midollo osseo, rendendo così anche più efficace e mirata la loro azione anti-leucemica. Allo scopo di migliorare ulteriormente la

capacità di infiltrazione delle cellule CAR-CIK nella nicchia, stiamo valutando anche una mutazione del recettore CXCR4 associata ad un guadagno di funzione (CXCR4^{R334X}), descritta nella sindrome di WHIM e associata con una superiore capacità di ritenzione dei leucociti all'interno del midollo osseo.

9.4 *Disegno di un costrutto CAR "bi-specifico" per colpire in concomitanza un marcatore della nicchia mieloide maligna e un antigene tipico dei blasti LMA*

Il targeting delle MSC all'interno del microambiente leucemico può interferire con la loro capacità di mantenere la sopravvivenza delle LSC. L'antigene CD146 (MCAM, *Melanoma Cell Adhesion Molecule*), è espresso da una sottopopolazione di cellule stromali umane derivate dal midollo osseo che hanno un ruolo attivo nell'organizzazione della nicchia staminale ematopoietica e sono implicate nella sopravvivenza e crescita di cellule tumorali all'interno di un modello in vivo di nicchia umanizzata ricreata in vivo.

9.5 *Produzione di CARCIK da sangue del cordone con l'obiettivo di ottenere una terapia CAR-T già pronta all'uso (definita anche "off the shelf")*

La terapia con cellule CAR-T sta mostrando significativi risultati di efficacia clinica nei pazienti con leucemia acuta a cellule B (B-LLA), che recidivano o che sono resistenti ad un precedente trattamento. Tuttavia, la produzione di cellule CAR-T da cellule mononucleate che originano del sangue periferico (PBMC) del paziente, hanno alcune limitazioni, tra le quali le tempistiche di produzione che non consentono di trattare il paziente con leucemia in recidiva, prima di 6/8 settimane, ponendo il clinico nella complessa situazione di dover gestire un paziente ad elevato rischio con terapie di salvataggio, nell'attesa di poter effettuare l'infusione di CAR-T. La rapida disponibilità di CB, il rischio minore segnalato di GVHD (nonostante disparità HLA riceventi/donatore) offerto dalla fonte CB rispetto alla fonte di PBMC e la possibilità di ottenere un elevato numero di cellule CIK effettrici anche a partire da materiale CB, rappresentano caratteristiche significative che possono aprire la strada all'impiego di cellule CAR-CIK derivate da CB, all'interno di una piattaforma non virale, che semplifica ulteriormente il processo produttivo e ne riduce i costi.

10. **Come la leucemia mieloide acuta modella la nicchia stromale midollare (Dr.sa M.Serafini)**

Recenti studi suggeriscono che la leucemia mieloide acuta (LMA) possa trasformare la nicchia midollare in un microambiente permissivo per la leucemia e sfavorevole per la normale emopoiesi. L'influenza della LMA sul differenziamento delle cellule osteogeniche e sull'architettura del tessuto osseo è stata già documentata in modelli murini. Tuttavia si sa poco sulle modifiche indotte dalla LMA sulle cellule staminali mesenchimali umane derivate dal midollo osseo di pazienti affetti da questa patologia. Con il fine di capire questo meccanismo, il nostro gruppo ha studiato la presenza di alterazioni intrinseche nel potenziale differenziativo delle cellule staminali mesenchimali di pazienti con LMA utilizzando due sistemi in vivo specifici per valutarne il potenziale osteogenico e la capacità di generare una nicchia stromale completa. I progenitori stromali midollari di pazienti pediatrici con LMA, mostrano un pattern di differenziazione intrinsecamente anomalo anche quando vengono rimossi dalla loro nicchia patologica. Tutte queste alterazioni possono contribuire all'inibizione della crescita delle normali cellule staminali ematopoietiche favorendo, invece, la sopravvivenza e l'espansione selettiva dei blasti.

11. **La nicchia della leucemia mieloide acuta regola la risposta al farmaco L-asparaginasi (Dr.ssa M. Serafini)**

L'eradicazione delle cellule staminali maligne è l'ultima sfida nel trattamento della leucemia. Le cellule staminali leucemiche (LSC) dirottano la normale nicchia emopoietica, dove sono principalmente protette dai farmaci citotossici. L'effetto anti-leucemico del farmaco L-asparaginasi (ASNase) è stato ampiamente studiato nella leucemia linfoblastica acuta, ma solo parzialmente nella leucemia mieloide acuta (LMA). Abbiamo esplorato la suscettibilità delle LSC all'ASNase, nonché il ruolo dei due principali tipi di cellule che costituiscono il microambiente del midollo osseo, ovvero cellule stromali mesenchimali e monociti / macrofagi. Mentre ASNase era efficace su entrambe le frazioni CD34 + CD38 + e CD34 + CD38- LSC, MSC e monociti / macrofagi hanno parzialmente neutralizzato l'effetto del farmaco. Il nostro lavoro ha dimostrato che, mentre MSC e monociti / macrofagi possono fornire una nicchia protettiva per le cellule AML, il farmaco ASNase ha un effetto citotossico sui blasti AML e, soprattutto, sulle sottopopolazioni LSC. Pertanto, queste caratteristiche dovrebbero essere considerate nella progettazione di futuri studi clinici volti a testare l'efficacia dell'ASNase nei pazienti con LMA.

12. **La combinazione della terapia enzimatica sostitutiva con il trapianto di cellule staminali ematopoietiche in epoca neonatale determina un miglioramento delle manifestazioni cliniche della mucopolisaccaridosi di tipo I (Dr.ssa M. Serafini)**

La mucopolisaccaridosi di tipo I (MPS-I), una malattia da accumulo lisosomiale causata da un deficit dell'enzima alfa-L-iduronidasi, provoca il progressivo accumulo di glicosaminoglicani e conseguente disfunzione multiorgano nei pazienti pediatrici affetti. Nonostante l'efficacia del trapianto di cellule staminali ematopoietiche (HSCT) e della terapia enzimatica sostitutiva (ERT) nella correzione delle manifestazioni cliniche legate agli organi viscerali, il completo miglioramento dei difetti muscoloscheletrici e neurocognitivi rimane ancora una sfida in quanto impatta la qualità della vita dei pazienti. Il progetto svolto negli ultimi anni ha permesso di testare l'efficacia terapeutica della combinazione della terapia enzimatica sostitutiva e del trapianto di cellule staminali ematopoietiche nel periodo neonatale. Utilizzando un modello murino della malattia, abbiamo dimostrato come la combinazione di queste terapie, se effettuate in un'epoca estremamente precoce, abbia migliorato le manifestazioni cliniche negli organi solitamente refrattari al trattamento corrente. Inoltre, questa combinazione ha impedito la produzione di anticorpi anti-IDUA che hanno un impatto negativo sull'efficacia della terapia enzimatica sostitutiva. La combinazione di entrambi i trattamenti ha anche portato ad una riduzione della severità delle anomalie scheletriche e una diminuzione della neuroinfiammazione e delle anomalie metaboliche neuronali. Poiché attualmente ci sono opzioni terapeutiche limitate per i pazienti con MPS-I, i nostri risultati suggeriscono che la combinazione di HSCT ed ERT durante il periodo neonatale può fornire un ulteriore passo avanti nel trattamento di questa malattia rara. Questo progetto è stato svolto in collaborazione con la Prof.ssa Riminucci M (*Dipartimento di Anatomia Patologica, Policlinico Umberto I, Università La Sapienza, Roma*) e con il Professor Shunji Tomatsu (*Hospital for Children di Willmington, DE, USA*) e con il Prof. Aiuti A (*Tiget, Ospedale San Raffaele, Milano*).

13. Isolamento e caratterizzazione di eritroblasti e trofoblasti fetali per un approccio di diagnosi prenatale non invasivo delle malattie genetiche (Progetto A. Menarini Biomarkers)

Questo progetto, svolto in collaborazione con la Prof.ssa Vergani P. (Unità di Ostetricia, Fondazione MBBM, Monza) si propone di isolare e caratterizzare i trofoblasti fetali dal sangue materno nelle prime settimane della gestazione (10-13 settimane) utilizzando una procedura di selezione basata sulla tecnologia DEPArray, per lo sviluppo di un metodo non invasivo di diagnosi prenatale. Il progetto è svolto con un supporto dell'azienda Menarini.

L'unità operativa Cellule Staminali e Immunoterapia è composta dalla dott.ssa Marta Serafini (capo unità), dott.ssa Alice Pievani (ricercatrice, Post-Doc), dott.ssa Sarah Tettamanti (Project leader), dott.ssa Valentina Granata (Post-Doc Associato), dott.ssa Marta Biondi (studentessa di dottorato DIMET), dott.ssa Gaia Alberti (studentessa di dottorato DIMET), dott.ssa Giada De Ponti (studentessa di dottorato DIMET), dott.ssa Chiara Tomasoni (studentessa di dottorato DIMET), dott.ssa Beatrice Cerina (biotecnologa), dott.ssa Ilaria Pisani (biologa).

14. Terapia molecolare della LLA (Dr. G. Gaipa)

14.1 Strategie multi targeting nella leucemia linfoblastica acuta (LLA) a cellule B: prevenzione dell'evasione immunitaria e delle ricadute post-trattamento con cellule CAR T

La terapia con cellule CAR rappresenta una nuova frontiera in questo setting della leucemia acuta linfoblastica di tipo B (LLA-B). Abbiamo recentemente dimostrato l'efficacia pre-clinica di cellule Cytokine Induced Killer (CIK) derivate da donatori e trasfettate con il trasposone CD19CAR (CARCIK-CD19) mediante vettori a trasposoni in un sistema Sleeping Beauty [1]. Le cellule CARCIK-CD19 esercitano una potente attività antitumorale in modelli murini immunodeficienti trapiantati con cellule di LLA-B ad alto rischio [2]. Sulla base di questi dati abbiamo avviato uno studio di fase I/II (EudraCT 2017-000900-38, ClinicalTrials. Gov ID NCT03389035), dimostrando la fattibilità, la sicurezza e l'efficacia delle cellule CARCIK-CD19 in pazienti pediatriche e adulti con LLA-B recidivante dopo trapianto di cellule staminali ematopoietiche. Tuttavia sebbene il CD19 sia espresso essenzialmente da tutti i casi di LLA-B alla diagnosi [4,5], le recidive con perdita o ridotta espressione sulla superficie cellulare del CD19 sono sempre più riconosciute come causa di fallimento del trattamento [6-9]. I dati preliminari del nostro laboratorio hanno identificato il ruolo della via BAFF/BAFF-Receptor (BAFF-R) nel supportare la sopravvivenza delle cellule B-ALL e nel contribuire alla resistenza del clone leucemico alla terapia nel microambiente BM [10]. In particolare, abbiamo dimostrato che BAFF-R è altamente espresso sui campioni diagnostici LLA-B e viene preservato durante il trattamento farmacologico e in caso di recidiva. Questi risultati hanno portato alla progettazione di una strategia per le cellule CAR T mirata a BAFF-R [11] e alla sua combinazione con l'approccio anti-CD19, dimostrando un'attività superiore anche nei confronti della leucemia recidivante B-ALL CD19-negativa. Il nuovo costrutto CAR esprime il BAFF-R è stato clonato con successo in plasmide ricombinate Pt4 e gli esperimenti preliminari di nucleofezione hanno dimostrato la sua espressione sulla superficie delle cellule trattate. Sulla base di questo risultato proseguiremo con ulteriori tappe: Cellule ingegnerizzate con il sistema sleeping beauty saranno valutate in vitro per la loro attività citotossica, proliferazione, vector copy number (VCN) e clearance della trasposasi SB100. L'efficacia in vivo dei linfociti CAR + T sarà valutata in topi NSG, precedentemente iniettati per via endovenosa (i.v.) con linee cellulari o con campioni primari di LLA-B.

14.2 Ruolo del microambiente nella attività biologica dei linfociti CARCIK anti-CD19

Al fine di una migliore comprensione dei fattori biologici determinanti l'efficacia e la durata dell'azione dei linfociti CAR T in vivo abbiamo ipotizzato che vi possano essere differenze rilevanti nel trascrittoma delle cellule CAR T che persistono a lungo termine rispetto a quello dei linfociti CAR T che perdono la loro capacità di espansione e durata. A questo scopo utilizzeremo una tecnica di Single-cell RNA sequencing per indagare il microambiente midollare, la componente della malattia residua e le cellule CAR T. Gli esperimenti saranno condotti in collaborazione con il Prof. M. Pagani (IFOM, Milano). Saranno utilizzati campioni ricavati da pazienti trattati con cellule CARCIK-CD19 o trattati con cellule CAR T commerciali. E' in corso la costruzione di una libreria di scRNAseq [Chromium Single Cell 5-library and V(D)J enrichment kit (10x Genomics)]. I dati attualmente ottenuti hanno dimostrato la fattibilità della procedura di sorting delle popolazioni in termini di purezza e vitalità. Abbiamo ora a disposizione piu' di 10 campioni raccolti da pazienti trattati con cellule CAR-T a diversi time points e con diversi gradi di risposta alla terapia sui quali indagheremo i parametri biologici sopra descritti.

14.3 Studio della malattia residua minima e monitoraggio immunologico dei pazienti trattati con cellule CAR T

Nell'ambito della nostra collaborazione con il consorzio europeo EUROFLOW (*in collaborazione con il Prof. Alberto Orfao, Salamanca*) saranno sviluppati pannelli di anticorpi specifici per la profilazione immunologica e funzionale di tutte le popolazioni cellulari misurabili durante il follow-up dei pazienti trattati con cellule CAR-T. Le potenzialità di questo approccio consentiranno lo studio fino a 250 sottopopolazioni cellulari in diversi time-points della terapia. In particolare la cinetica delle popolazioni cellulari infuse, la cinetica della malattia ad alta sensibilità e il profilo immunologico delle popolazioni cellulari autologhe. Sono già stati definiti i protocolli standard di preparazione dei campioni, la piattaforma database per la raccolta dei dati ed il software che consentirà l'analisi automatizzata dei dati citometrici ottenuti.

15. Sviluppo ed applicazione di tecnologie avanzate di Citometria di flusso (Dr. G. Gaipa)

15.1 Caratterizzazione immunofenotipica della JMML

Leucemia mielomonocitica giovanile (JMML) è un tumore raro della prima infanzia con prognosi severa. Attualmente la caratterizzazione immunofenotipica non è considerata informativa e non è inclusa nel work-up diagnostico della JMML. In questo studio abbiamo caratterizzato il compartimento cellulare CD34+ utilizzando un approccio completamente standardizzato sviluppato nell'ambito del consorzio Euroflow

Abbiamo identificato nel compartimento JMML CD34+ una *signature* fenotipica distintiva e consistente, caratterizzata da un rapporto invertito di precursori linfoidi B/ precursori linfoidi CD7 + e dalla presenza di una co-espressioni aberranti in proporzioni significativamente piu' rilevante rispetto ai precursori normali. Questo lavoro ha già passato la validazione statistica, e se confermato potrebbe rappresentare un rapido e nuovo strumento immunofenotipico da considerare nel work-up diagnostico della JMML, oltre ad una base per future investigazioni sulla natura della particolare signature fenotipica delle cellule CD34+ nei soggetti con JMML anche in relazione alle specifiche lesioni genetiche.

15.2 Sviluppo di pannelli di anticorpi standardizzati e di sistemi analitici automatizzati per la diagnosi ed il monitoraggio della leucemia linfoblastica acuta

Si tratta di progetti che si sviluppano attraverso la nostra collaborazione con il consorzio europeo Euroflow nell'ambito specifico delle LLA-B e delle LLA-T.

16. Analisi di singole cellule in LLA T per identificare il profilo di trasduzione del segnale e pathways associati a chemioresistenza

16.1 Profilo di trasduzione del segnale nella leucemia linfoblastica acuta pediatrica a cellule T mediante citometria di massa.

La tecnica di citometria di massa (CyTOF) consente la misurazione di oltre 40 parametri per singola cellula, rendendo questo approccio un metodo ideale per indagare la complessa biologia di T-ALL e per testare farmaci candidati per il targeting cellulare. Abbiamo caratterizzato campioni T-ALL pediatrici dimostrando la fattibilità del profilo cellulare di segnale basato su CyTOF delle vie principali di trasduzione del segnale. Abbiamo individuato pathways attivi nei blasti di T-ALL rispetto ai linfociti residui e abbiamo identificato cluster distinti di pazienti con risposta a IL-7 e inibitori del pathway PI3K/Akt/mTOR che suggeriscono mutua esclusività tra alterazioni genomiche del percorso JAK-STAT (o Ras) e alterazioni del percorso PI3K-AKT.

16.2 Efficacia *in vitro* di anticorpi monoclonali diretti contro antigeni associati alla leucemia linfoblastica acuta a cellule T (T-ALL).

Valutazione di un clone di anti-CD43 (UN-1) mediante test *in vitro* su linee leucemiche di T-ALL e su cellule primarie: Obiettivo è quello di stabilire la specificità e la efficienza di legame del clone UN-1 alle cellule T-ALL. Inoltre abbiamo studiato *in vitro* l'effetto sul segnale intracellulare sulla proliferazione, l'apoptosi ed il ciclo cellulare, in collaborazione con l'Università di Catanzaro (Prof. PierFrancesco Tassone).

L'Unità diretta dal Dr.G. Gaipa è costituita dalla Dr.ssa Magnani C.F., PhD (Project Leader); Dr.ssa Buracchi C., Biologa, PhD – Ricercatrice post-doc, Dr.ssa Bugarin C. Biologa, Assistente di Ricerca; Dr.ssa Giusi Melita G., Biologa, Assistente di Ricerca, Dr.ssa Ponzo M., PhD student, Dr. Alex Moretti, PhD student (da Novembre 2020); Dr. Quaroni M. Biologo, Assistente di Ricerca.

17. La Fondazione Tettamanti nell'emergenza Covid-19

Durante la pandemia causata da Covid-19 che ha colpito il nostro Paese e che attualmente sta causando una seconda ondata di recrudescenza, le attività di servizio diagnostico ai Centri AIEOP ricerca e di ricerca sono proseguite attivamente nel rispetto delle restrizioni che sono state imposte. Superati i mesi di "Lock-down" è stata data particolare attenzione all'aspetto formativo dei numerosi Dottorandi assegnati ai Ricercatori della FT, proseguendo nel contatto attraverso le piattaforme disponibili e organizzando una turnazione in laboratorio per non interrompere gli esperimenti, fondamentali per il loro programma formativo.

L'impegno di una Dottoranda (Dr.ssa L.R. Bettini) e di un Medico Specialista in Ematologia e Pediatria (Dr.ssa M. D'Angiò), attualmente presso il Centro Tettamanti, ha reso inoltre possibile la partecipazione a network prestigiosi di ricerca che sono stati attivati proprio durante le fasi più acute della pandemia da un Network Europeo e dal National Institute of Health (NIH) di Bethesda (USA). Grazie al loro lavoro di raccolta, separazione e crio-preservazione sono stati raccolti i campioni di oltre 750 pazienti ricoverati a Monza nei mesi di marzo, aprile e maggio nell'ambito di uno studio osservazionale retrospettivo (Covid-19 Storm) promosso dal Prof. Biondi nell'ambito dell'Unità di Crisi dell'Ospedale San Gerardo. I risultati di tali ricerche

sono stati oggetto di pubblicazioni su prestigiose riviste internazionali che hanno contribuito ad identificare nuovi e rilevanti aspetti nella patogenesi dell'infezione da Covid-19.

B. Progetti di ricerca traslazionale clinica a sostegno dei protocolli dell'Associazione Italiana Ematologia ed Oncologia Pediatrica (Dr. G. Cazzaniga)

L'arruolamento a studi clinici controllati costituisce la modalità ottimale per garantire il trattamento ad ogni bambino e rappresenta uno dei motivi del successo nella cura delle leucemie e linfomi pediatrici. L'organizzazione di uno studio di ricerca clinica richiede risorse aggiuntive in termini di organizzazione, gestione ed esecuzioni di indagini di laboratorio, non tutti riconosciuti dai costi di assistenza del servizio sanitario nazionale.

La Clinica Pediatrica di Monza è coordinatrice dal 1988 dei protocolli dell'AIEOP per la LAL (che dal 2000 sono realizzati congiuntamente ai gruppi cooperativi di Germania ed Austria), dal 2003 per le ricadute LAL; inoltre gestisce i protocolli internazionali per i sottogruppi di LAL del bambino di età inferiore LAL'anno (Interfant), e per la LAL Ph+ (EsPhALL). Complessivamente in termini di attività, presso le unità di Biologia Molecolare e di Citogenetica del Centro Ricerca Tettamanti di Monza vengono riferiti il materiale per le analisi ed i dati dei 400 bambini ed adolescenti affetti da leucemia acuta linfoblastica in Italia e oltre il 10% direttamente per le cure.

Presso il Centro Ricerca Tettamanti vengono eseguite le indagini molecolari e di malattia residua minima necessari per l'assegnazione di tutti i pazienti italiani con LAL al più appropriato braccio di protocollo terapeutico, in funzione della fascia di rischio.

Nello stesso contesto di genetica molecolare, il Centro Ricerca Tettamanti è promotore di progetti di ricerca, associati ai protocolli clinici, per la caratterizzazione dell'eterogeneità genomica di sottogruppi di pazienti AIEOP con diversa risposta alla terapia.

Identificazione di alterazioni prognostiche e target terapeutici nelle LAL pediatriche (Dr. G. Cazzaniga, Dr.ssa G. Fazio, Dr.ssa S. Rigamonti, Dr. Andrea Grioni)

L'utilizzo di tecnologie genomiche di avanguardia (SNP arrays e sequenziamento massivo di nuova generazione, NGS) ci ha permesso di analizzare ad altissima risoluzione il genoma delle cellule leucemiche, con lo scopo di individuare lesioni genetiche che cooperano nella trasformazione di una cellula normale in una leucemica. Abbiamo partecipato a studi collaborativi con lo scopo di identificare nuovi eventi leucemogenici, marcatori prognostici ed alterazioni che possano rappresentare potenziali target terapeutici (*vedi bibliografia*). Di rilievo, lo studio sulla presenza di particolari conformazioni geniche associate alla predisposizione alla leucemia e ai meccanismi alla base delle alterazioni nel sottogruppo più ricorrente di LAL pediatriche.

Nello specifico:

i) è stato introdotto nella routine di screening un pannello diagnostico basato sulla ricostruzione della sequenza dei geni le cui alterazioni rivestono un ruolo prognostico nelle LAL pediatriche, con particolare interesse nei casi ABL-class; ad oggi abbiamo sequenziato più di 300 campioni BCP-LAL riscontrando sia geni di fusione convenzionali sia nuovi (*Manoscritto in preparazione*);

ii) abbiamo introdotto lo screening di tutti i casi di LAL B-other con la nuova tecnologia digitalMLPA, per riconoscere il sottogruppo denominato 'Ikaros-plus', che consiste di un pattern di delezioni geniche dal significato prognostico;

iii) nel contesto della partecipazione attiva al gruppo Europeo 'Euroclonality-NGS', abbiamo messo a punto il riconoscimento dei marcatori IG/TR usati per il monitoraggio di Malattia Residua Minima mediante NGS. Ciò ha consentito di sviluppare un approccio integrato di diagnostica molecolare avanzata NGS per identificare in pazienti arruolati al protocollo LAL AIEOP geni di fusione prognostici e/o bersaglio di farmaci alternativi e specifici.

Le persone coinvolte nell'attività diagnostica sono complessivamente 18: 3 nel Settore Morfologia/Immunofenotipo, 11 nel Settore Biologia Molecolare, 3 nel Settore Citogenetica. Nonostante il Laboratorio di Diagnostica Emato-Oncologica M.Tettamanti faccia capo alla Fondazione MBBM, il personale dedica una parte della propria professionalità e tempo a progetti di ricerca clinica di FT.

La funzione di coordinamento di protocolli clinici comporta non solo gli oneri delle attività di laboratorio eseguite presso il Centro Ricerca Tettamanti ma anche quelli relativi alla parte metodologica, statistica e di analisi dei dati eseguite presso il Centro Operativo Ricerca statistica (CORS) della Fondazione M. Tettamanti (diretto dalla Prof.ssa M.G. Valsecchi e composto da Daniela Silvestri e Paola De Lorenzo).

C. Attività di Formazione

Prosegue l'attività di formazione di studenti dei programmi di Dottorato dell'Università di Milano-Bicocca nell'ambito del "PhD Program in Translational Medicine" (DIMET). Sono attualmente 18 i dottorandi, di cui 3 dell'ultimo anno.

I ricercatori Senior del Centro Ricerca Tettamanti partecipano attivamente, con attività di tutoring, al 'Programma Virgilio', un innovativo percorso pre-laurea di formazione in ricerca biomedica per studenti di medicina e chirurgia. Il programma mira a formare studenti di medicina interessati ad approfondire la loro comprensione dei metodi di ricerca e del collegamento tra le scienze di base e la ricerca nelle scienze cliniche. Il Programma Virgilio è finanziato dalla Fondazione Cariplo e vede partecipare in modo congiunto Università degli Studi di Milano-Bicocca, Università degli Studi di Milano e Humanitas University.

Da oltre 30 la Clinica Pediatrica e la FT sono impegnate in programmi di supporto formativo sia tecnico che scientifico per tecnici e ricercatori provenienti da centri di onco-ematologia pediatrica di Paesi a risorse limitate. Le iniziative di formazione iniziate nell'ambito della MISPHO (Monza's International School of Pediatric Hematology Oncology) hanno trovate nel 2019 il riconoscimento come Centro dipartimentale di "Global Pediatric Medicine". La cooperazione internazionale nell'ambito della formazione riguarda personale proveniente da Paesi dell'America Latina ma anche dai paesi dell'est Europa come Croazia e Serbia. Più recentemente è stata fornita attività di supporto formativo a biologi provenienti dall' Hiwa Cancer Hospital di Sulaimany (Iraq/ Kurdistan region), nel contesto di un progetto di collaborazione internazionale. La formazione avviene a Monza dove il personale viene ospitato per periodi variabili, affiancato ai nostri tecnici e biologi al fine di fornire strumenti tecnici e culturali da importare nei laboratori di origine, al fine del miglioramento continuo nella cura della leucemia infantile. In particolare, il laboratorio di Monza ha ospitato in questi ultimi

anni personale in formazione nell'ambito della cito-morfologia, della citofluorimetria e della biologia molecolare.

D. Finanziamenti della ricerca

I progetti di ricerca condotti presso il Centro Ricerca Tettamanti sono finanziati, oltre che dal Comitato Maria Letizia Verga (vedi Convenzioni annuali), da Enti pubblici e Privati a sostegno della ricerca medica (AIRC, Fondazione Cariplo, Ministero dell'Università e Ricerca, Ministero della Salute, Regione Lombardia, Associazione Sindrome di Shwachman, Associazioni di familiari di bambini con leucemia). Nel 2019-2020 sono ben 11 i grant in corso che le diverse Agenzie Italiane ed Europee hanno assegnato su base competitiva alle ricerche di Fondazione Tettamanti (5 AIRC, Fondazione Cariplo, 3 EU H2020, AISS, 2 AIFA), oltre a 3 contratti di committenza per Enti esterni.

I ricercatori di FT partecipano a network europei specifici per le diverse attività: International-BFM Study Group, EuroMRD, EuroFlow, EuroClonality-NGS.

E. Pubblicazioni scientifiche del Centro Tettamanti (2019-2020)

Nel periodo 2019 e parte del 2020, sono stati prodotti e pubblicati **74 lavori scientifici su riviste internazionali** peer-reviewed (di cui viene allegato elenco separatamente).



Prof. Andrea Biondi

Direttore Scientifico

Fondazione M. Tettamanti M. De Marchi

E. Pubblicazioni scientifiche del Centro Tettamanti (2019-2020)

1. Saettini F, Poli C, Vengoechea J, Bonanomi S, Orellana JC, Fazio G, Rodriguez FH, Noguera LP, Booth CA, Jarur-Chamy V, Shams M, Iascone M, Vukic M, Gasperini S, Quadri M, Barroeta Seijas AB, Rivers E, Mauri M, Badolato R, **Cazzaniga** G, Bugarin C, Gaipa G, Kroes W, Moratto D, van Ostaijen-Ten Dam MM, Baas F, van der Maarel S, Piazza R, Coban-Akdemir Z, Lupski JR, Yuan B, Chinn IK, Daxinger L, Biondi A. Absent B cells, agammaglobulinemia, and hypertrophic cardiomyopathy in Folliculin Interacting Protein 1 deficiency. *Blood*. 2020 Sep 9;blood.2020006441. doi: 10.1182/blood.2020006441. Online ahead of print.
2. Saettini F, Castelli I, Provenzi M, Fazio G, Quadri M, **Cazzaniga** G, Sala S, Dell'Acqua F, Sieni E, Coniglio ML, Pezzoli L, Iascone M, Vendemini F, Balduzzi AC, Biondi A, Rizzari C, Bonanomi S. A novel homozygous disruptive PRF1 variant (K285Sfs*4) causes very early-onset of familial hemophagocytic lymphohistiocytosis type 2. *Pediatr Hematol Oncol*. 2020 Jul 22:1-5.
3. Saettini F, Fazio G, Corti P, Quadri M, Bugarin C, Gaipa G, Penco F, Moratto D, Chiarini M, Baronio M, Gazzarelli L, Imberti L, Paghera S, Giliani S, **Cazzaniga** G, Plebani A, Badolato R, Lougaris V, Gattorno M, Biondi A. Two siblings presenting with novel ADA2 variants, lymphoproliferation, persistence of large granular lymphocytes, and T-cell perturbations. *Clin Immunol*. 2020 Sep; 218:108525. doi: 10.1016/j.clim.2020.108525. Epub 2020 Jul 11.
4. Mazzola M, Pezzotta A, Fazio G, Rigamonti A, Bresciani E, Gaudenzi G, Pelleri MC, Saitta C, Ferrari L, Parma M, Fumagalli M, Biondi A, **Cazzaniga** G, Marozzi A, Pistocchi A. Dysregulation of NIPBL leads to impaired RUNX1 expression and haematopoietic defects. *J Cell Mol Med*. 2020 Jun; 24(11):6272-6282.
5. Beneforti L, Dander E, Bresolin S, Bueno C, Acunzo D, Bertagna M, Ford A, Gentner B, Kronnie GT, Vergani P, Menéndez P, Biondi A, **D'Amico** G, Palmi C, **Cazzaniga** G. Pro-inflammatory cytokines favor the emergence of ETV6-RUNX1-positive pre-leukemic cells in a model of mesenchymal niche. *Br J Haematol*. 2020 Jul;190(2):262-273.
6. Schieck M, Lentjes J, Thomay K, Hofmann W, Behrens YL, Hagedorn M, Ebersold J, Davenport CF, Fazio G, Möricke A, Buchmann S, Alten J, Cario G, Schrappe M, Bergmann AK, Stanulla M, Steinemann D, Schlegelberger B, **Cazzaniga** G, Göhring G. Implementation of RNA sequencing and array CGH in the diagnostic workflow of the AIEOP-BFM ALL 2017 trial on acute lymphoblastic leukemia. *Ann Hematol*. 2020 Apr;99(4):809-818.
7. Attarbaschi A, Mann G, Zimmermann M, Bader P, Barisone E, Basso G, Biondi A, Cario G, **Cazzaniga** G, Colombini A, Flotho C, Kuhlen M, Lang P, Lauten M, Linderkamp C, Locatelli F, Lo Nigro L, Möricke A, Niggli F, Panzer-Grümayer R, Parasole R, Peters C, Caterina Putti M, Rizzari C, Suttorp M, Valsecchi MG, Conter V, Schrappe M; AIEOP-BFM (Associazione Italiana di Ematologia e Oncologia Pediatrica & Berlin-Frankfurt-Münster) Study Group. Randomized post-induction and delayed intensification therapy in high-risk pediatric acute lymphoblastic leukemia: long-term results of the international AIEOP-BFM ALL 2000 trial. *Leukemia*. 2020 Jun;34(6):1694-1700.
8. Grioni A, Fazio G, Rigamonti S, Bystry V, Daniele G, Dostalova Z, Quadri M, Saitta C, Silvestri D, Songia S, Storlazzi CT, Biondi A, Darzentas N, **Cazzaniga** G. A Simple RNA Target Capture NGS Strategy for Fusion

Genes Assessment in the Diagnostics of Pediatric B-cell Acute Lymphoblastic Leukemia. *Hemasphere*. 2019 Jun 4;3(3):e250.

9. Bader P, Salzmann-Manrique E, Balduzzi A, Dalle JH, Woolfrey AE, Bar M, Verneris MR, Borowitz MJ, Shah NN, Gossai N, Shaw PJ, Chen AR, Schultz KR, Kreyenberg H, Di Maio L, **Cazzaniga** G, Eckert C, van der Velden VHJ, Sutton R, Lankester A, Peters C, Klingebiel TE, Willasch AM, Grupp SA, Pulsipher MA. More precisely defining risk peri-HCT in pediatric ALL: pre- vs post-MRD measures, serial positivity, and risk modeling. *Blood Adv*. 2019 Nov 12;3(21):3393-3405.
10. Cario G, Leoni V, Conter V, Attarbaschi A, Zaliova M, Sramkova L, **Cazzaniga** G, Fazio G, Sutton R, Elitzur S, Izraeli S, Lauten M, Locatelli F, Basso G, Buldini B, Bergmann AK, Lentès J, Steinemann D, Göhring G, Schlegelberger B, Haas OA, Schewe D, Buchmann S, Moericke A, White D, Revesz T, Stanulla M, Mann G, Bodmer N, Arad-Cohen N, Zuna J, Valsecchi MG, Zimmermann M, Schrappe M, Biondi A. Relapses and treatment-related events contributed equally to poor prognosis in children with ABL-class fusion positive B-cell acute lymphoblastic leukemia treated according to AIEOP-BFM protocols. *Haematologica*. 2020 Jul;105(7):1887-1894.
11. Germano G, Valsecchi MG, Buldini B, **Cazzaniga** G, Zanon C, Silvestri D, Te Kronnie G, Basso G, Paganin M. Next-generation sequencing of PTEN mutations for monitoring minimal residual disease in T-cell acute lymphoblastic leukemia. *Pediatr Blood Cancer*. 2020 Jan;67(1):e28025.
12. Fazio F, Barberi W, **Cazzaniga** G, Fazio G, Messina M, Della Starza I, De Propriis MS, Mancini F, Mohamed S, Del Giudice I, Chiaretti S, Moleti ML, Guarini A, Foà R, Testi AM. Efficacy of imatinib and chemotherapy in a pediatric patient with Philadelphia-like acute lymphoblastic leukemia with Ebf1-Pdgfrb fusion transcript. *Leuk Lymphoma*. 2020 Feb;61(2):469-472.
13. Brüggemann M, Kotrová M, Knecht H, Bartram J, Boudjogrha M, Bystry V, Fazio G, Froňková E, Giraud M, Grioni A, Hancock J, Herrmann D, Jiménez C, Krejci A, Moppett J, Reigl T, Salson M, Scheijen B, Schwarz M, Songia S, Svaton M, van Dongen JJM, Villarese P, Wakeman S, Wright G, **Cazzaniga** G, Davi F, García-Sanz R, Gonzalez D, Groenen PJTA, Hummel M, Macintyre EA, Stamatopoulos K, Pott C, Trka J, Darzentas N, Langerak AW; EuroClonality-NGS working group. Standardized next-generation sequencing of immunoglobulin and T-cell receptor gene recombinations for MRD marker identification in acute lymphoblastic leukaemia; a EuroClonality-NGS validation study. *Leukemia*. 2019 Sep;33(9):2241-2253.
14. Knecht H, Reigl T, Kotrová M, Appelt F, Stewart P, Bystry V, Krejci A, Grioni A, Pal K, Stranska K, Plevova K, Rijntjes J, Songia S, Svatoň M, Froňková E, Bartram J, Scheijen B, Herrmann D, García-Sanz R, Hancock J, Moppett J, van Dongen JJM, **Cazzaniga** G, Davi F, Groenen PJTA, Hummel M, Macintyre EA, Stamatopoulos K, Trka J, Langerak AW, Gonzalez D, Pott C, Brüggemann M, Darzentas N; EuroClonality-NGS Working Group. Quality control and quantification in IG/TR next-generation sequencing marker identification: protocols and bioinformatic functionalities by EuroClonality-NGS. *Leukemia*. 2019 Sep;33(9):2254-2265.
15. Federico C, Owoka T, Ragusa D, Sturiale V, Caponnetto D, Leotta CG, Bruno F, Foster HA, Rigamonti S, Giudici G, **Cazzaniga** G, Bridger JM, Sisu C, Saccone S, Tosi S. Deletions of Chromosome 7q Affect Nuclear Organization and HLXB9Gene Expression in Hematological Disorders. *Cancers (Basel)*. 2019 Apr 25;11(4):585.

16. Luong-Gardiol N, Siddiqui I, Pizzitola I, Jeevan-Raj B, Charmoy M, Huang Y, Irmisch A, Curtet S, Angelov GS, Danilo M, Juilland M, Bornhauser B, Thome M, Hantschel O, Chalandon Y, **Cazzaniga** G, Bourquin JP, Huelsken J, Held W. γ -Catenin-Dependent Signals Maintain BCR-ABL1+ B Cell Acute Lymphoblastic Leukemia. *Cancer Cell*. 2019 Apr 15;35(4):649-663
17. Fazio G, Massa V, Grioni A, Bystry V, Rigamonti S, Saitta C, Galbiati M, Rizzari C, Consarino C, Biondi A, Selicorni A, **Cazzaniga** G. First evidence of a paediatric patient with Cornelia de Lange syndrome with acute lymphoblastic leukaemia. *J Clin Pathol*. 2019 Aug;72(8):558-561.
18. Meyer C, Lopes BA, Caye-Eude A, Cavé H, Arfeuille C, Cuccuini W, Sutton R, Venn NC, Oh SH, Tsaur G, Escherich G, Feuchtinger T, Kosasih HJ, Khaw SL, Ekert PG, Pombo-de-Oliveira MS, Bidet A, Djahanschiri B, Ebersberger I, Zaliova M, Zuna J, Zermanova Z, Juvonen V, Grümayer RP, Fazio G, **Cazzaniga** G, Larghero P, Emerenciano M, Marschalek R. Human MLL/KMT2A gene exhibits a second breakpoint cluster region for recurrent MLL-USP2 fusions. *Leukemia*. 2019 Sep;33(9):2306-2340.
19. Lopes BA, Meyer C, Barbosa TC, Poubel CP, Mansur MB, Duployez N, Bashton M, Harrison CJ, Zur Stadt U, Horstmann M, Pombo-de-Oliveira MS, Palmi C, **Cazzaniga** G, Venn NC, Sutton R, Alonso CN, Tsaur G, Gupta SK, Bakhshi S, Marschalek R, Emerenciano M. IKZF1 Deletions with COBL Breakpoints Are Not Driven by RAG-Mediated Recombination Events in Acute Lymphoblastic Leukemia. *Transl Oncol*. 2019 May;12(5):726-732
20. Pfeifer H, **Cazzaniga** G, van der Velden VHJ, Cayuela JM, Schäfer B, Spinelli O, Akiki S, Avigad S, Bendit I, Borg K, Cavé H, Elia L, Reshmi SC, Gerrard G, Hayette S, Hermanson M, Juh A, Jurcek T, Chillón MC, Homburg C, Martinelli G, Kairisto V, Lange T, Lion T, Mueller MC, Pane F, Rai L, Damm-Welk C, Sacha T, Schnittger S, Touloumenidou T, Valerhaugen H, Vandenberghe P, Zuna J, Serve H, Herrmann E, Markovic S, Dongen JJM, Ottmann OG. Standardisation and consensus guidelines for minimal residual disease assessment in Philadelphia-positive acute lymphoblastic leukemia (Ph+ ALL) by real-time quantitative reverse transcriptase PCR of e1a2 BCR-ABL1. *Leukemia*. 2019 Aug;33(8):1910-1922.
21. Portale F, Beneforti L, Fallati A, Biondi A, Palmi C, **Cazzaniga** G, Dander E, **D'Amico** G. Activin A contributes to the definition of a pro-oncogenic bone marrow microenvironment in t(12;21) preleukemia. *Exp Hematol*. 2019 May;73:7-12.e4.
22. Agraz-Doblas A, Bueno C, Bashford-Rogers R, Roy A, Schneider P, Bardini M, Ballerini P, **Cazzaniga** G, Moreno T, Revilla C, Gut M, Valsecchi MG, Roberts I, Pieters R, De Lorenzo P, Varela I, Menendez P, Stam RW. Unraveling the cellular origin and clinical prognostic markers of infant B-cell acute lymphoblastic leukemia using genome-wide analysis. *Haematologica*. 2019 Jun;104(6):1176-1188.
23. Mazzola M, Deflorian G, Pezzotta A, Ferrari L, Fazio G, Bresciani E, Saitta C, Ferrari L, Fumagalli M, Parma M, Marasca F, Bodega B, Riva P, Cotelli F, Biondi A, Marozzi A, **Cazzaniga** G, Pistocchi A. NIPBL: a new player in myeloid cell differentiation. *Haematologica*. 2019 Jul;104(7):1332-1341.
24. Valli R, Minelli A, Galbiati M, **D'Amico** G, Frattini A, Montalbano G, Khan AW, Porta G, Millefanti G, Olivieri C, Cipolli M, Cesaro S, Pasquali F, Danesino C, **Cazzaniga** G, Maserati E. Shwachman-Diamond syndrome with clonal interstitial deletion of the long arm of chromosome 20 in bone marrow: haematological features, prognosis and genomic instability. *Br J Haematol*. 2019 Mar;184(6):974-981

25. Bottai D, Spreafico M, Pistocchi A, Fazio G, Adami R, Grazioli P, Canu A, Bragato C, Rigamonti S, Parodi C, **Cazzaniga G**, Biondi A, Cotelli F, Selicorni A, Massa V. Modeling Cornelia de Lange syndrome in vitro and in vivo reveals a role for cohesin complex in neuronal survival and differentiation. *Hum Mol Genet.* 2019 Jan 1;28(1):64-73.
26. Losurdo M, Pedrazzoli M, D'Agostino C, Elia CA, Massenzio F, Lonati E, Mauri M, Rizzi L, Molteni L, Bresciani E, Dander E, **D'Amico G**, Bulbarelli A, Torsello A, Matteoli M, Buffelli M, Coco S. Intranasal delivery of mesenchymal stem cell-derived extracellular vesicles exerts immunomodulatory and neuroprotective effects in a 3xTg model of Alzheimer's disease. *Stem Cells Transl Med.* 2020. 9:1068-1084.
27. Rigoni R, Fontana E, Dobbs K, Marrella V, Taverniti V, Maina V, Facoetti A, **D'Amico G**, Al-Herz W, Cruz-Munoz ME, Schuetz C, Gennery AR, Garabedian EK, Giliani S, Draper D, Dbaibo G, Geha RS, Meyts I, Tousseyn T, Neven B, Moshous D, Fischer A, Schulz A, Finocchi A, Kuhns DB, Fink DL, Lionakis MS, Swamydas M, Guglielmetti S, Alejo J, Myles IA, Pittaluga S, Notarangelo LD, Villa A, Cassani B. Cutaneous barrier leakage and gut inflammation drive skin disease in Omenn syndrome. *J Allergy Clin Immunol.* 2020 Apr 18:S0091-6749(20)30492-9.
28. Fumagalli G., Monfrini M., Donzelli E., Rodriguez-Menendez V., Bonandrini B., Figliuzzi M., Remuzzi A., **D'Amico G.**, Cavaletti G., Scuteri A. Protective Effect of Human Mesenchymal Stem Cells on the Survival of Pancreatic Islets. *Int J Stem Cells.* 2020. 13:116-126.
29. Chiu M, Taurino G, Bianchi MG, Dander E, Fallati A, Giuliani N, **D'Amico G**, Bussolati O. Functional Consequences of Low Activity of Transport System A for Neutral Amino Acids in Human Bone Marrow Mesenchymal Stem Cells. *Int J Mol Sci.* 2020 Mar 10;21(5):1899
30. Vella A, D'Aversa E, Api M, Breveglieri G, Allegri M, Giacomazzi A, Marinelli Busilacchi E, Fabrizzi B, Cestari T, Sorio C, Bedini G, **D'Amico G**, Bronte V, Poloni A, Benedetti A, Bovo C, Corey SJ, Borgatti M, Cipolli M, Bezzeri V. mTOR and STAT3 Pathway Hyper-Activation is Associated with Elevated Interleukin-6 Levels in Patients with Shwachman-Diamond Syndrome: Further Evidence of Lymphoid Lineage Impairment. *Cancers.* 2020 Mar 5;12(3):597.
31. Portale F, Cricri G, Bresolin S, Lupi M, Gaspari S, Silvestri D, Russo B, Marino N, Ubezio P, Pagni F, Vergani P, Kronnie GT, Valsecchi MG, Locatelli F, Rizzari C, **Biondi A**, Dander E, **D'Amico G**. ActivinA: a new leukemia-promoting factor conferring migratory advantage to B-cell precursor-acute lymphoblastic leukemic cells. *Haematologica.* 2019. 104(3):533-545.
32. Rambaldi B, Diral E, Donsante S, Di Marzo N, Mottadelli F, Cardinale L, Dander E, Isimbaldi G, Pioltelli P, **Biondi A**, Riminucci M, D'Amico G, Elli EM, **Pievani A**, **Serafini M**. Heterogeneity of the bone marrow niche in patients with myeloproliferative neoplasms: ActivinA secretion by mesenchymal stromal cells correlates with the degree of marrow fibrosis. *Ann Hematol.* 2020 Oct 21. doi: 10.1007/s00277-020-04306-w. Epub ahead of print. PMID: 33089365.

33. Manfredi F, Cianciotti BC, Potenza A, Tassi E, Noviello M, **Biondi A**, Ciceri F, Bonini C, Ruggiero E. TCR Redirected T Cells for Cancer Treatment: Achievements, Hurdles, and Goals. *Front Immunol.* 2020 Sep 3;11:1689. doi:10.3389/fimmu.2020.01689. PMID: 33013822; PMCID: PMC7494743.
34. Bastard P, Rosen LB, Zhang Q, Michailidis E, Hoffmann HH, Zhang Y, Dorgham K, Philippot Q, Rosain J, Béziat V, Manry J, Shaw E, Haljasmägi L, Peterson P, Lorenzo L, Bizien L, Trouillet-Assant S, Dobbs K, de Jesus AA, Belot A, Kallaste A, Catherinot E, Tandjaoui-Lambiotte Y, Le Pen J, Kerner G, Bigio B, Seeleuthner Y, Yang R, Bolze A, Spaan AN, Delmonte OM, Abers MS, Aiuti A, Casari G, Lampasona V, Piemonti L, Ciceri F, Bilguvar K, Lifton RP, Vasse M, Smadja DM, Migaud M, Hadjadj J, Terrier B, Duffy D, Quintana-Murci L, van de Beek D, Roussel L, Vinh DC, Tangye SG, Haerynck F, Dalmau D, Martinez-Picado J, Brodin P, Nussenzweig MC, Boisson-Dupuis S, Rodríguez-Gallego C, Vogt G, Mogensen TH, Oler AJ, Gu J, Burbelo PD, Cohen JI, **Biondi A**, **Bettini LR**, **D'Angio M**, Bonfanti P, Rossignol P, Mayaux J, Rieux-Laucat F, Husebye ES, Fusco F, Ursini MV, Imberti L, Sottini A, Paghera S, Quiros-Roldan E, Rossi C, Castagnoli R, Montagna D, Licari A, Marseglia GL, Duval X, Ghosn J; HGID Lab; NIAID-USUHS Immune Response to COVID Group; COVID Clinicians; COVID-STORM Clinicians; Imagine COVID Group; French COVID Cohort Study Group; Milieu Intérieur Consortium; CoV-Contact Cohort; Amsterdam UMC Covid-19 Biobank; COVID Human Genetic Effort, Tsang JS, Goldbach-Mansky R, Kisand K, Lionakis MS, Puel A, Zhang SY, Holland SM, Gorochov G, Jouanguy E, Rice CM, Cobat A, Notarangelo LD, Abel L, Su HC, Casanova JL. Autoantibodies against type I IFNs in patients with life-threatening COVID-19. *Science.* 2020 Oct 23;370(6515):eabd4585. doi: 10.1126/science.abd4585. Epub 2020 Sep 24. PMID: 32972996.
35. Zhang Q, Bastard P, Liu Z, Le Pen J, Moncada-Velez M, Chen J, Ogishi M, SablilKD, Hodeib S, Korol C, Rosain J, Bilguvar K, Ye J, Bolze A, Bigio B, Yang R, Arias AA, Zhou Q, Zhang Y, Onodi F, Korniotis S, Karpf L, Philippot Q, Chbihi M, Bonnet-Madin L, Dorgham K, Smith N, Schneider WM, Razoosky BS, Hoffmann HH, Michailidis E, Moens L, Han JE, Lorenzo L, Bizien L, Meade P, Neehus AL, Ugurbil AC, Corneau A, Kerner G, Zhang P, Rapaport F, Seeleuthner Y, Manry J, Masson C, Schmitt Y, Schlüter A, Le Voyer T, Khan T, Li J, Fellay J, Roussel L, Shahrooei M, Alosaimi MF, Mansouri D, Al-Saud H, Al-Mulla F, Almourfi F, Al-Muhsen SZ, Alsohime F, Al Turki S, Hasanato R, van de Beek D, **Biondi A**, **Bettini LR**, **D'Angio M**, Bonfanti P, Imberti L, Sottini A, Paghera S, Quiros-Roldan E, Rossi C, Oler AJ, Tompkins MF, Alba C, Vandernoot I, Goffard JC, Smits G, Migeotte I, Haerynck F, Soler-Palacin P, Martin-Nalda A, Colobran R, Morange PE, Keles S, Çölkesen F, Özcelik T, Yasar KK, Senoglu S, Karabela ŞN, Rodríguez-Gallego C, Novelli G, Hraiech S, Tandjaoui-Lambiotte Y, Duval X, Laouénan C; COVID-STORM Clinicians; COVID Clinicians; Imagine COVID Group; French COVID Cohort Study Group; CoV-Contact Cohort; Amsterdam UMC Covid-19 Biobank; COVID Human Genetic Effort; NIAID-USUHS/TAGC COVID Immunity Group, Snow AL, Dalgard CL, Milner JD, Vinh DC, Mogensen TH, Marr N, Spaan AN, Boisson B, Boisson-Dupuis S, Bustamante J, Puel A, Ciancanelli MJ, Meyts I, Maniatis T, Soumelis V, Amara A, Nussenzweig M, García-Sastre A, Krammer F, Pujol A, Duffy D, Lifton RP, Zhang SY, Gorochov G, Béziat V, Jouanguy E, Sancho-Shimizu V, Rice CM, Abel L, Notarangelo LD, Cobat A, Su HC, Casanova JL. Inborn errors of type I IFN immunity in patients with life-threatening COVID-19. *Science.* 2020 Oct 23;370(6515):eabd4570. doi:10.1126/science.abd4570. Epub 2020 Sep 24. PMID: 32972995.

36. Clavenna A, Nardelli S, Sala D, Fontana M, **Biondi A**, Bonati M. Impact of COVID-19 on the Pattern of Access to a Pediatric Emergency Department in the Lombardy Region, Italy. *Pediatr Emerg Care*. 2020 Oct;36(10):e597-e598. doi:10.1097/PEC.0000000000002232. PMID: 32826641.
37. Lougaris V, Pession A, Baronio M, Soresina A, Rondelli R, Gazzurelli L, Benvenuto A, Martino S, Gattorno M, **Biondi A**, Zecca M, Marinoni M, Fabio G, Aiuti A, Marseglia G, Putti MC, Agostini C, Lunardi C, Tommasini A, Bertolini P, Gambineri E, Consolini R, Matucci A, Azzari C, Danieli MG, Paganelli R, Duse M, Cancrini C, Moschese V, Chessa L, Spadaro G, Civino A, Vacca A, Cardinale F, Martire B, Carpino L, Trizzino A, Russo G, Cossu F, Badolato R, Pietrogrande MC, Quinti I, Rossi P, Ugazio A, Pignata C, Plebani A. The Italian Registry for Primary Immunodeficiencies (Italian Primary Immunodeficiency Network; IPINet): Twenty Years of Experience (1999-2019). *J Clin Immunol*. 2020 Oct;40(7):1026-1037. doi: 10.1007/s10875-020-00844-0. Epub 2020 Aug 15. PMID:32803625; PMCID: PMC7505879.
38. Meyran D, Petit A, Guilhot J, Suttorp M, Sedlacek P, De Bont E, Li CK, Kalwak K, Lausen B, Culic S, de Moerloose B, Biondi A, Millot F. Lymphoblastic predominance of blastic phase in children with chronic myeloid leukaemia treated with imatinib: A report from the I-CML-Ped Study. *Eur J Cancer*. 2020 Sep;137:224-234. doi: 10.1016/j.ejca.2020.06.024. Epub 2020 Aug 13. PMID:32799036.
39. Snyder TM, Gittelman RM, Klinger M, May DH, Osborne EJ, Taniguchi R, Zahid HJ, Kaplan IM, Dines JN, Noakes MN, Pandya R, Chen X, Elasady S, Svejnoha E, Ebert P, Pesesky MW, De Almeida P, O'Donnell H, DeGottardi Q, Keitany G, Lu J, Vong A, Elyanow R, Fields P, Greissl J, Baldo L, Semprini S, Cerchione C, Mazza M, Delmonte OM, Dobbs K, Carreño-Tarragona G, Barrio S, Imberti L, Sottini A, Quiros-Roldan E, Rossi C, **Biondi A**, **Bettini LR**, **D'Angio M**, Bonfanti P, Tompkins MF, Alba C, Dalgard C, Sambri V, Martinelli G, Goldman JD, Heath JR, Su HC, Notarangelo LD, Martinez-Lopez J, Carlson JM, Robins HS. Magnitude and Dynamics of the T-Cell Response to SARS-CoV-2 Infection at Both Individual and Population Levels. *medRxiv [Preprint]*. 2020 Aug 4:2020.07.31.20165647. doi:10.1101/2020.07.31.20165647. PMID: 32793919; PMCID: PMC7418734.
40. **Magnani CF**, **Gaipa G**, Lussana F, Belotti D, Gritti G, Napolitano S, **Matera G**, **Cabiati B**, **Buracchi C**, Borleri G, Fazio G, Zaninelli S, **Tettamanti S**, **Cesana S**, **Colombo V**, Quaroni M, **Cazzaniga G**, Rovelli A, **Biagi E**, Galimberti S, Calabria A, Benedicenti F, Montini E, Ferrari S, Introna M, Balduzzi A, **Valsecchi MG**, **Dastoli G**, Rambaldi A, **Biondi A**. Sleeping Beauty-engineered CAR T cells achieve antileukemic activity without severe toxicities. *J Clin Invest*. 2020 Oct 12:138473. doi: 10.1172/JCI138473. Epub ahead of print. PMID: 32780725.
41. Saettini F, Herriot R, Prada E, Nizon M, Zama D, Marzollo A, Romaniouk I, Lougaris V, Cortesi M, Morreale A, Kosaki R, Cardinale F, Ricci S, Domínguez-Garrido E, Montin D, Vincent M, Milani D, **Biondi A**, Gervasini C, Badolato R. Prevalence of Immunological Defects in a Cohort of 97 Rubinstein-Taybi Syndrome Patients. *J Clin Immunol*. 2020 Aug;40(6):851-860. doi:10.1007/s10875-020-00808-4. Epub 2020 Jun 27. PMID: 32594341.
42. **Severe Covid-19 GWAS Group**, Ellinghaus D, Degenhardt F, Bujanda L, Buti M, Albillos A, Invernizzi P, Fernández J, Prati D, Baselli G, Asselta R, Grimsrud MM, Milani C, Aziz F, Kässens J, May S, Wendorff M, Wienbrandt L, Uellendahl-Werth F, Zheng T, Yi X, de Pablo R, Chercoles AG, Palom A, Garcia-Fernandez AE, Rodriguez-Frias F, Zanella A, Bandera A, Protti A, Aghemo A, Lleo A, **Biondi A**, Caballero-Garralda A, Gori A, Tanck A, Carreras Nolla A, Latiano A, Fracanzani AL, Peschuck A, Julià A, Pesenti A, Voza A, Jiménez D, Mateos B, Nafria Jimenez B, Quereda C, Paccapelo C, Gassner C, Angelini C, Cea C, Solier A, Pestaña D, Muñoz-Díaz E, Sandoval E, Paraboschi EM, Navas E, García Sánchez F, Ceriotti F, Martinelli-Boneschi F,

- Peyvandi F, Blasi F, Téllez L, Blanco-Grau A, Hemmrich-Stanisak G, Grasselli G, Costantino G, Cardamone G, Foti G, Aneli S, Kurihara H, EIAbd H, My I, Galván-Femenia I, Martín J, Erdmann J, Ferrusquía-Acosta J, Garcia-Etxebarria K, Izquierdo-Sanchez L, **Bettini LR**, Sumoy L, Terranova L, Moreira L, Santoro L, Scudeller L, Mesonero F, Roade L, Rühlemann MC, Schaefer M, Carrabba M, Riveiro-Barciela M, Figuera Basso ME, Valsecchi MG, Hernandez-Tejero M, Acosta-Herrera M, **D'Angiò M**, Baldini M, Cazzaniga M, Schulzky M, Cecconi M, Wittig M, Ciccarelli M, Rodríguez-Gandía M, Bocciolone M, Miozzo M, Montano N, Braun N, Sacchi N, Martínez N, Özer O, Palmieri O, Faverio P, Preatoni P, Bonfanti P, Omodei P, Tentorio P, Castro P, Rodrigues PM, Blandino Ortiz A, de Cid R, Ferrer R, Gualtierotti R, Nieto R, Goerg S, Badalamenti S, Marsal S, Matullo G, Pelusi S, Juzenas S, Aliberti S, Monzani V, Moreno V, Wesse T, Lenz TL, Pumarola T, Rimoldi V, Bosari S, Albrecht W, Peter W, Romero-Gómez M, D'Amato M, Duga S, Banales JM, Hov JR, Folseraas T, Valenti L, Franke A, Karlsen TH. Genomewide Association Study of Severe Covid-19 with Respiratory Failure. *N Engl J Med.* 2020 Oct 15;383(16):1522-1534. doi: 10.1056/NEJMoa2020283. Epub 2020 Jun 17. PMID: 32558485; PMCID: PMC7315890.
43. Lanfranconi F, Zardo W, Moriggi T, Villa E, Radaelli G, Radaelli S, Paoletti F, Bottes E, Miraglia T, Pollastri L, Vago P, Nichelli F, Jankovic M, **Biondi A**, Balduzzi A. Precision-based exercise as a new therapeutic option for children and adolescents with haematological malignancies. *Sci Rep.* 2020 Jul 30;10(1):12892. doi: 10.1038/s41598-020-69393-1. PMID: 32733066; PMCID: PMC7393502.
44. Popov A, Buldini B, De Lorenzo P, Disarò S, Verzhbitskaya T, Movchan L, Giarin E, Shorikov E, Di Meglio A, Tsaur G, Parasole R, Miakova N, Boichenko E, Kondratchik K, Aleinikova O, Karachunskiy A, Roumiantsev A, Locatelli F, **Biondi A**, Pieters R, Valsecchi MG, Fechina L, Basso G. Prognostic value of minimal residual disease measured by flow-cytometry in two cohorts of infants with acute lymphoblastic leukemia treated according to either MLL-Baby or Interfant protocols. *Leukemia.* 2020 Nov;34(11):3042-3046. doi: 10.1038/s41375-020-0912-z. Epub 2020 Jun 12. PMID: 32533093.
45. **Rotiroti MC**, **Buracchi C**, Arcangeli S, **Galimberti S**, **Valsecchi MG**, Perriello VM, Rasko T, **Alberti G**, **Magnani CF**, Cappuzzello C, Lundberg F, Pande A, **Dastoli G**, Introna M, **Serafini M**, Biagi E, Izsvák Z, **Biondi A**, **Tettamanti S**. Targeting CD33 in Chemoresistant AML Patient-Derived Xenografts by CAR-CIK Cells Modified with an Improved SB Transposon System. *Mol Ther.* 2020 Sep 2;28(9):1974-1986. doi: 10.1016/j.ymthe.2020.05.021. Epub 2020 May 30. PMID: 32526203; PMCID: PMC7474266.
46. Parasole R, Stellato P, Conter V, De Matteo A, D'Amato L, Colombini A, Pecoraro C, Bencivenga C, Raimondo M, Silvestri S, Tipo V, Annicchiarico Petruzzelli L, Giagnuolo G, Curatolo A, **Biondi A**, Menna G. Collateral effects of COVID-19 pandemic in pediatric hematooncology: Fatalities caused by diagnostic delay. *Pediatr Blood Cancer.* 2020 Aug;67(8):e28482. doi: 10.1002/pbc.28482. Epub 2020 Jun 11. PMID: 32525616; PMCID: PMC7300556
47. **Bonaccorso P**, **Bugarin C**, **Buracchi C**, **Fazio G**, **Biondi A**, Lo Nigro L, **Gaipa G**. Single-cell profiling of pediatric T-cell acute lymphoblastic leukemia: Impact of PTEN exon 7 mutation on PI3K/Akt and JAK-STAT signaling pathways. *Cytometry B Clin Cytom.* 2020 Jun 1. doi: 10.1002/cyto.b.21882. Epub ahead of print. PMID: 32479694.
48. **Magnani CF**, **Tettamanti S**, **Alberti G**, **Pisani I**, **Biondi A**, **Serafini M**, **Gaipa G**. Transposon-Based CAR T Cells in Acute Leukemias: Where are We Going? *Cells.* 2020 May 27;9(6):1337. doi: 10.3390/cells9061337. PMID: 32471151; PMCID: PMC7349235.

49. Ferrari A, Zecca M, Rizzari C, Porta F, Provenzi M, Marinoni M, Schumacher RF, Luksch R, Terenziani M, Casanova M, Spreafico F, Chiaravalli S, Compagno F, Bruni F, Piccolo C, **Bettini L, D'Angiò M**, Ferrari GM, **Biondi A**, Massimino M, Balduzzi A. Children with cancer in the time of COVID-19: An 8-week report from the six pediatric onco-hematology centers in Lombardia, Italy. *Pediatr Blood Cancer*. 2020 Aug;67(8):e28410. doi: 10.1002/pbc.28410. Epub 2020 May 26. PMID:32452123; PMCID: PMC7267084.
50. **Pievani A, Biondi M, Tomasoni C, Biondi A, Serafini M**. Location First: Targeting Acute Myeloid Leukemia Within Its Niche. *J Clin Med*. 2020 May 18;9(5):1513. doi: 10.3390/jcm9051513. PMID: 32443460; PMCID: PMC7290711.
51. **Santi L**, De Ponti G, Dina G, **Pievani A**, Corsi A, Riminucci M, Khan S, Sawamoto K, Antolini L, Gregori S, Annoni A, **Biondi A**, Quattrini A, Tomatsu S, **Serafini M**. Neonatal combination therapy improves some of the clinical manifestations in the Mucopolysaccharidosis type I murine model. *Mol Genet Metab*. 2020 Jul;130(3):197-208. doi: 10.1016/j.ymgme.2020.05.001. Epub 2020 May 11. PMID: 32439268.
52. Cario G, Leoni V, Conter V, Baruchel A, Schrappe M, **Biondi A**. BCR-ABL1-like acute lymphoblastic leukemia in childhood and targeted therapy. *Haematologica*. 2020 May 15;105(9):207019. doi: 10.3324/haematol.2018.207019. Epub ahead of print. PMID: 32414845; PMCID: PMC7556506.
53. **Pievani A**, Donsante S, **Tomasoni C**, Corsi A, Dazzi F, **Biondi A**, Riminucci M, **Serafini M**. Acute myeloid leukemia shapes the bone marrow stromal niche in vivo. *Haematologica*. 2020 May 7;haematol.2020.247205. doi:10.3324/haematol.2020.247205. Epub ahead of print. PMID: 32381570.
54. Balduzzi A, Brivio E, Rovelli A, Rizzari C, Gasperini S, Melzi ML, Conter V, **Biondi A**. Lessons after the early management of the COVID-19 outbreak in a pediatric transplant and hemato-oncology center embedded within a COVID-19 dedicated hospital in Lombardia, Italy. *Estote parati. Bone Marrow Transplant*. 2020 Oct;55(10):1900-1905. doi: 10.1038/s41409-020-0895-4. Epub 2020 Apr 20. PMID: 32313181; PMCID: PMC7167532.
55. Bouffet E, Challinor J, Sullivan M, **Biondi A**, Rodriguez-Galindo C, Pritchard-Jones K. Early advice on managing children with cancer during the COVID-19 pandemic and a call for sharing experiences. *Pediatr Blood Cancer*. 2020 Jul;67(7):e28327. doi: 10.1002/pbc.28327. Epub 2020 Apr 24. PMID: 32239747.
56. Vitello AS, Clavenna A, Cartabia M, Sala D, **Biondi A**, Bonati M. Evaluation of the Pattern of Use of a Pediatric Emergency Department in Italy. *Pediatr Emerg Care*. 2020 Mar 30. doi: 10.1097/PEC.0000000000002091. Epub ahead of print. PMID: 32229785.
57. Saettini F, Cattoni A, **D'Angio' M**, Corti P, Maitz S, Pagni F, Seminati D, Pezzoli L, Iascone M, **Biondi A**, Bonanomi S. Intermittent granulocyte maturation arrest, hypocellular bone marrow, and episodic normal neutrophil count can be associated with SRP54 mutations causing Shwachman-Diamond-like syndrome. *Br J Haematol*. 2020 May;189(4):e171-e174. doi: 10.1111/bjh.16585. Epub 2020 Mar 20. PMID: 32196641.
58. Franca R, Stocco G, Favretto D, Giurici N, Del Rizzo I, Locatelli F, Vinti L, **Biondi A**, Colombini A, Fagioli F, Barisone E, Pelin M, Martellosi S, Ventura A, Decorti G, Rabusin M. PACSIN2 rs2413739 influence on thiopurine pharmacokinetics: validation studies in pediatric patients. *Pharmacogenomics J*. 2020 Jun;20(3):415-425. doi: 10.1038/s41397-019-0130-0. Epub 2019 Dec 3. PMID:31792371
59. Testi AM, Attarbaschi A, Valsecchi MG, Mörcke A, Cario G, Niggli F, Silvestri D, Bader P, Kuhlen M, Parasole R, Putti MC, Lang P, Flotho C, Mann G, Rizzari C, Barisone E, Locatelli F, Linderkamp C, Lauten M, Suttorp M, Zimmermann M, Basso G, Biondi A, Conter V, Schrappe M; AIEOP-BFM (Associazione Italiana di Ematologia e Oncologia Pediatrica & Berlin-Frankfurt-Münster) Study Group. Outcome of adolescent patients

- with acute lymphoblastic leukaemia aged 10-14 years as compared with those aged 15-17 years: Long-term results of 1094 patients of the AIEOP-BFM ALL 2000 study. *Eur J Cancer*. 2019 Nov;122:61-71. doi:10.1016/j.ejca.2019.09.004. Epub 2019 Oct 17. PMID: 31629941.
60. Ottaviano G, Marinoni M, Graziani S, Sibson K, Barzaghi F, Bertolini P, Chini L, Corti P, Cancrini C, D'Alba I, Gabelli M, Gallo V, Giancotta C, Giordano P, Lassandro G, Martire B, Angarano R, Mastrodicasa E, Bava C, Miano M, Naviglio S, Verzegnassi F, Saracco P, Trizzino A, **Biondi A**, Pignata C, Moschese V. Rituximab Unveils Hypogammaglobulinemia and Immunodeficiency in Children with Autoimmune Cytopenia. *J Allergy Clin Immunol Pract*. 2020 Jan;8(1):273-282. doi:10.1016/j.jaip.2019.07.032. Epub 2019 Aug 2. PMID: 31377437.
61. Pieters R, De Lorenzo P, Ancliffe P, Aversa LA, Brethon B, **Biondi A**, Campbell M, Escherich G, Ferster A, Gardner RA, Kotecha RS, Lausen B, Li CK, Locatelli F, Attarbaschi A, Peters C, Rubnitz JE, Silverman LB, Sary J, Szczepanski T, Vora A, Schrappe M, Valsecchi MG. Outcome of Infants Younger Than 1 Year With Acute Lymphoblastic Leukemia Treated With the Interfant-06 Protocol: Results From an International Phase III Randomized Study. *J Clin Oncol*. 2019 Sep;37(25):2246-2256. doi: 10.1200/JCO.19.00261. Epub 2019 Jul 8. PMID: 31283407.
62. **Michelozzi IM**, Granata V, De Ponti G, **Alberti G**, **Tomasoni C**, Antolini L, Gambacorti-Passerini C, Gentner B, Dazzi F, **Biondi A**, Coliva T, Rizzari C, **Pievani A**, **Serafini M**. Acute myeloid leukaemia niche regulates response to L-asparaginase. *Br J Haematol*. 2019 Aug;186(3):420-430. doi: 10.1111/bjh.15920. Epub 2019 May 1. PMID: 31044436.
63. Arienti F, Pansieri C, Pandolfini C, **Biondi A**, Bonati M. Globalization of pediatric research: pharmacological RCTs in Latin America. *Ital J Pediatr*. 2019 Mar 4;45(1):29. doi: 10.1186/s13052-019-0622-1. PMID: 30832712; PMCID: PMC6398244.
64. Ferrari A, Brecht IB, Gatta G, Schneider DT, Orbach D, Cecchetto G, Godzinski J, Reguerre Y, Bien E, Stachowicz-Stencel T, Ost M, Magni C, Kearns P, Vassal G, Massimino M, **Biondi A**, Bisogno G, Trama A. Defining and listing very rare cancers of paediatric age: consensus of the Joint Action on Rare Cancers in cooperation with the European Cooperative Study Group for Pediatric Rare Tumors. *Eur J Cancer*. 2019 Mar;110:120-126. doi: 10.1016/j.ejca.2018.12.031. Epub 2019 Feb 19. PMID: 30785015.
65. Bagnasco F, Caruso S, Andreano A, Valsecchi MG, Jankovic M, Biondi A, Miligi L, Casella C, Terenziani M, Massimino M, Sacerdote C, Morsellino V, Erminio G, Garaventa A, Faraci M, Micalizzi C, Garrè ML, Pillon M, Basso G, Biasin E, Fagioli F, Rondelli R, Pession A, Locatelli F, Santoro N, Indolfi P, Palumbo G, Russo G, Verzegnassi F, Favre C, Zecca M, Mura R, D'Angelo P, Cano C, Byrne J, Haupt R; OTR-AIEOP Registry. Late mortality and causes of death among 5-year survivors of childhood cancer diagnosed in the period 1960-1999 and registered in the Italian Off-Therapy Registry. *Eur J Cancer*. 2019 Mar;110:86-97. doi:10.1016/j.ejca.2018.12.021. Epub 2019 Feb 14. PMID: 30772657.
66. Colombatti R, Martella M, Cattaneo L, Viola G, Cappellari A, Bergamo C, Azzena S, Schiavon S, Baraldi E, Dalla Barba B, Trafojer U, Corti P, Uggeri M, Tagliabue PE, Zorloni C, Bracchi M, **Biondi A**, Basso G, Masera N, Sainati L. Results of a multicenter universal newborn screening program for sickle cell disease in Italy: A call to action. *Pediatr Blood Cancer*. 2019 May;66(5):e27657. doi: 10.1002/pbc.27657. Epub 2019 Feb 5. PMID: 30724025.
67. Rizzari C, Lanvers-Kaminsky C, Valsecchi MG, Ballerini A, Matteo C, Gerss J, Wuertwein G, Silvestri D, Colombini A, Conter V, **Biondi A**, Schrappe M, Moericke A, Zimmermann M, von Stackelberg A, Linderkamp

- C, Frühwald MC, Legien S, Attarbaschi A, Reismüller B, Kasper D, Smisek P, Stary J, Vinti L, Barisone E, Parasole R, Micalizzi C, Zucchetti M, Boos J. Asparagine levels in the cerebrospinal fluid of children with acute lymphoblastic leukemia treated with pegylated-asparaginase in the induction phase of the AIEOP-BFM ALL 2009 study. *Haematologica*. 2019 Sep;104(9):1812-1821. doi: 10.3324/haematol.2018.206433. Epub 2019 Jan 31. PMID: 30705097; PMCID: PMC6717578.
68. Faverio P, Stainer A, De Giacomi F, Gasperini S, Motta S, Canonico F, Pieruzzi F, Monzani A, Pesci A, **Biondi A**. Molecular Pathways and Respiratory Involvement in Lysosomal Storage Diseases. *Int J Mol Sci*. 2019 Jan 15;20(2):327. doi: 10.3390/ijms20020327. PMID: 30650529; PMCID: PMC6359090.
69. Martella M, Viola G, Azzena S, Schiavon S, **Biondi A**, Basso G, Corti P, Colombatti R, Masera N, Sainati L. Evaluation of Technical Issues in a Pilot Multicenter Newborn Screening Program for Sickle Cell Disease. *Int J Neonatal Screen*. 2018 Dec 21;5(1):2. doi: 10.3390/ijns5010002. PMID: 33072962; PMCID: PMC7510190.
70. Brown P, Pieters R, **Biondi A**. How I treat infant leukemia. *Blood*. 2019 Jan 17;133(3):205-214. doi: 10.1182/blood-2018-04-785980. Epub 2018 Nov 20. PMID: 30459160.
71. Tomatsu S, Taylor M, Khan S, Stapleton M, Wang J, Chen J, Wynn R, Yabe H, Chinen Y, Boelens JJ, Mason RW, Kubaski F, Horovitz D, Barth A, **Serafini M**, Bernardo ME, Kobayashi H, Orii K, Suzuki Y, Orii T. (2019) Hematopoietic stem cell transplantation for mucopolysaccharidoses; past, present, and future". *Biol Blood Marrow Transplant*. 2019 Jul;25(7): e226-e246.
72. Capo V, Penna S, Merelli I, Barcella M, Scala S, Basso-Ricci L, Draghici E, Palagano E, Zonari E, Desantis G, Uva P, Cusano R, Sergi Sergi L, Crisafulli L, Moshous D, Stepensky P, Drabko K, Kaya Z, Unal E, Gezdirici A, Menna G, **Serafini M**, Aiuti A, Locatelli SL, Carlo-Stella C, Schulz AS, Ficara F, Sobacchi C, Gentner B, Villa A. Expanded circulating hematopoietic stem/progenitor cells as novel cell source for the treatment of TCIRG1 osteopetrosis. *Haematologica*. 2020 Jan 16: haematol.2019.238261. doi: 10.3324/haematol.2019.238261. Online ahead of print. PMID: 31949009
73. de Soccio G, Savastano V, Minasi S, Bertin S, **Serafini M**, Vittori T, Riminucci M, Corsi A. Solitary juvenile xanthogranuloma of the hypopharynx. Clinico-pathologic study in a child with β -Thalassemia Major and Cutaneous Mastocytosis. *Int J Pediatr Otorhinolaryngol*. 2020 Aug;135: 110088. doi: 10.1016/j.ijporl.2020.110088. Epub 2020 May 5. PMID: 3250593
74. Corsi A, Palmisano B, Spica E, Di Filippo A, Coletta I, Dello Spedale Venti M, Labella R, Fabretti F, Donsante S, Remoli C, **Serafini M**, Riminucci M. Zoledronic Acid in a Mouse Model of Human Fibrous Dysplasia: Ineffectiveness on Tissue Pathology, Formation of "Giant Osteoclasts" and Pathogenetic Implications. *Calcif Tissue Int*. 2020 Sep 1. doi: 10.1007/s00223-020-00752-w. Online ahead of print. PMID: 32875378



Per lo studio e la cura delle leucemie ed emopatie infantili

Fondazione M. Tettamanti - M. De Marchi ONLUS

Eretta in Ente morale con D.P.R. 24/02/1987

Prefettura di Monza e Brianza n. 8/133/1