

Bilancio sociale
al rendiconto al 31/12/2020
(predisposto ai sensi dell'articolo 14 Dlgs 117/2017)

Metodologia adottata per la redazione del bilancio sociale

Il presente documento rappresenta il Bilancio Sociale 2020 “di Fondazione Tettamanti” redatto ispirandosi alle “Linee guida per la redazione del bilancio sociale degli enti del Terzo settore”, adottate con il Decreto 4 luglio 2019 dal Ministero del Lavoro e delle Politiche Sociali.

Il Bilancio Sociale della Fondazione ha l’obiettivo di presentare alle molteplici categorie di Stakeholder informazioni chiare e trasparenti in merito alle responsabilità, ai comportamenti e ai risultati ottenuti attraverso le attività svolte nel corso dell’esercizio sociale iniziato il 1 gennaio 2020 e concluso il 31 dicembre 2020.

I contenuti oggetto di rendicontazione sono stati selezionati sulla base dei risultati dell’analisi di materialità condotta nel 2020, che ha permesso di individuare gli aspetti materiali per la Fondazione e per i suoi Stakeholder, anche alla luce di quanto richiesto dalle “Linee guida per la redazione del bilancio sociale degli enti del Terzo settore”.

Informazioni generali sull'ente:

- nome dell'ente: FONDAZIONE M.TETTAMANTI M. DE MARCHI - ONLUS
- codice fiscale: 95587550153
- forma giuridica e qualificazione ai sensi del Codice del Terzo settore:
Dotato di personalità giuridica, costituita in data 22/05/1985 con atto n. 296337/12722, iscritta all’Anagrafe delle ONLUS, al Registro Persone Giuridiche Prefettura di Monza n. ordine 8 pag. 133 della parte analitica
- indirizzo sede legale: Monza (MB) Via G.B. Pergolesi, 33
telefono 039 233.36.61
e-mail fondazione.tettamanti@asst-monza.it
PEC: fondazionetettamanti@pec.it
Web www.fondazionetettamanti.it
- altre sedi: //
- aree territoriali di operatività: LOMBARDIA e tutto il territorio nazionale
- valori e finalità perseguite (missione dell'ente): studio e cura delle leucemie e delle emopatie infantili
- attività statutarie individuate facendo riferimento all'articolo 5 Dlgs 117/2017 e/o all'articolo 2 Dlgs 112/2017 (oggetto sociale): **ricerca scientifica di particolare interesse sociale –**

La missione

Comprendere i meccanismi alla base della leucemia e identificare terapie innovative per la cura mediante le più **aggiornate tecniche molecolari**, la diagnosi ed il monitoraggio delle anomalie genetiche presenti nei bambini leucemici italiani al momento dell’esordio della malattia.

Tale indagine è di primaria importanza non solo per la corretta diagnosi, ma soprattutto per l’impostazione delle **terapie più idonee** e per la **valutazione della risposta alla terapia**.

La visione

Promuovere la solidarietà sociale (come determinata dallo art. 10, commi 2 e 3, del Decreto Legislativo 460/1997) e **promuovere tutte le ricerche utili ad assicurare al bambino leucemico, o sofferente di altre emopatie, il più alto livello di terapia intesa nella dimensione medico - biologica, psicologica e sociale.**

La Fondazione svolge la propria attività nel settore 1) dell'assistenza sociale e socio-sanitaria, 2) dell'assistenza sanitaria, 3) della beneficenza, 5) della formazione, 11) della ricerca scientifica di particolare interesse sociale (Art. 10, comma 1, lettera a), del D. Lgs. 4 dicembre 1997, n. 460), preclusa qualsiasi attività diversa da quelle sopra indicate; più precisamente, l'attività della Fondazione è, in particolare, incentrata sullo studio e sulla terapia delle leucemie ed emopatie infantili, senza finalità di lucro, e con l'esclusivo perseguimento di finalità di solidarietà sociale (come determinate dall'art. 10, commi 2 e 3, del Decreto Legislativo 460/1997).

Nell'ambito di tale attività, la Fondazione ha i seguenti scopi:

a - promuovere la solidarietà sociale (come determinata dallo art. 10, commi 2 e 3, del Decreto Legislativo 460/1997);

b - promuovere tutte le ricerche utili ad assicurare al bambino leucemico, o sofferente di altre emopatie, il più alto livello di terapia intesa nella dimensione medico — biologica, psicologica e sociale.

La Fondazione attua tale scopo:

- mediante convenzioni con Università o altri Enti di ricerca aventi ad oggetto la collaborazione scientifica nell'ambito della ricerca traslazionale e clinica;
- promuovendo e sostenendo le attività di studio e ricerca volte a migliorare le cure del bambino leucemico od emopatico;
- potenziando e attivando laboratori specializzati nello studio e ricerca delle leucemie ed emopatie;
- assumendo operatori la cui attività sia ritenuta essenziale al conseguimento degli scopi indicati;
- istituendo una biblioteca scientifica a disposizione degli studiosi;
- curando pubblicazioni scientifiche, promuovendo convegni da svolgere come attività connesse;
- organizzando corsi di formazione rivolti ad operatori sanitari di paesi svantaggiati al fine di assicurare le migliori cure ai bambini leucemici o sofferenti di altre emopatie, corsi sempre esercitati in via connessa;
- favorendo contatti con centri nazionali e stranieri che perseguono scopi uguali o affini;
- favorendo tutte le iniziative volte ad agevolare il reinserimento dal bambino leucemico od emopatico nel contesto sociale (famiglia, scuola, attività ricreative, lavoro);
- adottando ogni altra iniziativa volta a migliorare l'efficienza e lo sviluppo della Fondazione nello svolgimento delle attività scientifiche.

- contesto di riferimento:

- **Nasce nel 1987**, all'interno dell'Ospedale San Gerardo di Monza, per la ricerca e lo studio delle leucemie infantili.
- Nel 1995 viene inaugurato il **Centro di Ricerca M. Tettamanti istituzione scientifica "no-profit"**. Il Centro opera nel campo della ricerca sulle leucemie ed emopatie infantili ed è parte della Clinica Pediatrica dell'Università di Milano Bicocca.

Nel 2015 il Centro di ricerca Tettamanti si trasferisce all'interno del Centro ML Verga:

- **1300 mq** di laboratori
- **50** tecnici e ricercatori

- **5** unità di ricerca
- **400** diagnosi e monitoraggi l'anno
- **2,3 milioni** di euro all'anno investiti nella ricerca
- **oltre 50** protocolli all'anno

Centro Maria Letizia Verga

La costruzione del nuovo Centro Maria Letizia Verga per lo Studio e la Cura della Leucemia del Bambino è sicuramente il progetto più grande di sempre voluto e finanziato dal Comitato Maria Letizia Verga e condotto dalla Fondazione MBBM.

Lanciato come progetto nel marzo 2013, ha visto la nascita del cantiere a novembre 2013 e la consegna dell'edificio nell'aprile 2015, mentre il trasferimento di tutte le attività ospedaliere è avvenuto a giugno 2015.

L'impegno economico totale è stato di 14 milioni di Euro.

Il Centro Maria Letizia Verga per lo studio e la cura della leucemia del bambino è un sistema integrato di risposte alle complesse esigenze del bambino malato di leucemia e della sua famiglia. Unisce ricerca, cura, terapia ed assistenza. Nasce dalla iniziativa privata a favore del pubblico, per offrire a tutti le migliori cure e la possibilità di guarire, in un contesto che si fa carico di tutte le necessità pratiche ed emotive della famiglia.

L'edificio è realizzato su 4 piani e 8400 mq. Ospita il Day Hospital, il Centro Ricerche Tettamanti i reparti di degenza, il Centro per i Trapianti di Midollo Osseo le aree riservate ai medici, gli spazi per l'accoglienza e i servizi per i bambini e le famiglie e nel prossimo futuro vedrà la realizzazione di una palestra di riabilitazione motoria per i bambini ed i ragazzi in cura e di un giardino d'inverno situati al quarto piano della palazzina.

Un ospedale nato per essere casa e per dare a tutti coloro che vi operano e che ne usufruiscono il confort e la sicurezza necessari per affrontare il difficile percorso della malattia.

La filosofia che ha guidato l'intero progetto è stata quella di far "disegnare" l'ospedale da tutti i suoi utenti: i bambini prima di tutto, che attraverso disegni, video e interviste hanno chiesto un ospedale accogliente, colorato, giocoso; i genitori, che devono poter trascorrere lunghi periodi nel massimo comfort e con il supporto di servizi qualificati; il personale sanitario, che ha potuto esprimere tutte le esigenze operative per poter lavorare con la massima qualità ed efficienza.

Il "Centro Maria Letizia Verga", finanziato e realizzato grazie a donazioni da privati, viene gestito in piena autonomia e responsabilità dalla "Fondazione Monza e Brianza per il Bambino e la sua Mamma (MBBM)".

Il Centro di Emato-oncologia Pediatrica di Monza, oggi presso il Centro Maria Letizia Verga per lo studio e la cura della leucemia del bambino, è oggi una struttura di riferimento nazionale e internazionale per la ricerca e il trattamento delle emopatie infantili. E' Centro di riferimento specialistico in Lombardia per le malattie oncoematologiche pediatriche con esclusione delle patologie congenite della coagulazione. Ogni anno sono diagnosticati circa 80 nuovi casi di leucemia e linfomi in bambini e adolescenti. Grazie al miglioramento delle terapie il numero di bambini che ormai hanno sospeso le cure, e sono da considerare guariti, è andato progressivamente aumentando.

A seguito della sua apertura sono state effettuate tramite il Comitato ML Verga diverse opere di miglioria, anche strutturale, in particolare la realizzazione di una palestra dedicata alle attività di Sport Therapy e un terrazzo attrezzato dedicato alle attività degli adolescenti.

A settembre 2020 sono iniziate delle opere di manutenzione ordinaria per il rifacimento della pavimentazione di alcune zone ad alta densità di passaggio, che manifestavano i primi segni di usura, e la riverniciatura della facciata esterna.

Alla data attuale i lavori, che pure hanno visto una necessaria sospensione di mesi di novembre, dicembre e gennaio, dovuta al riacutizzarsi della situazione emergenziale degli ospedali per la pandemia Covid 19, vedono completate le opere di rifacimento dei pavimenti nelle zone di passaggio, negli studi medici e la ristrutturazione completa di 3 stanze.

Inoltre già nel mese di ottobre 2020 è stata completata la riverniciatura della struttura all'esterno e nel mese di aprile 2021 sono state collocate le nuove insegne.

Struttura, governo e amministrazione:

Gli organi Statutari

Consiglio di Amministrazione

Provvede all'amministrazione ordinaria e straordinaria ed alla gestione della Fondazione, con criteri di economicità, efficacia ed efficienza, nell'ambito dei piani, dei progetti e delle linee di bilancio approvati dal Consiglio di Indirizzo

Nomina il Direttore Scientifico

Presidente

Dott. Luigi Pergiuuseppe Ferdinando Roth

Componenti

Prof. Andrea Biondi -Direttore Sceintifico

Prof. Giuseppe Masera

Sig. Giovanni Verga

Dott. Mauro Gallavotti

Direttore Scientifico

Definisce i profili di assistenza, scientifici e di ricerca in ordine all'attività della Fondazione e predispone il programma annuale delle iniziative.

Collegio Sindacale

Accerta la regolare tenuta delle scritture contabili, esamina le proposte di bilancio preventivo e di rendiconto economico e finanziario, redigendo apposite relazioni ed effettua verifiche di cassa

Presidente:

Presidente: **dott.ssa Barbara Russo**

Componenti:

dott.ssa Stefania Bianchi

dott. Marco Pessina

I destinatari (stakeholder)

I principali stakeholder della Fondazione Tettamanti sono:

- i bambini leucemici o sofferenti di qualsiasi altra emopatia;
- i bambini in cura presso la Clinica Pediatrica della Fondazione MBBM;
- le famiglie dei bambini;
- il personale (ricercatori, biologi, tecnici, medici, infermieri, personale di supporto);
- l'Università Milano Bicocca;
- gli Enti nazionali e internazionali per la ricerca;
- i sostenitori;
- la collettività in genere;
- la stampa e i mezzi di comunicazione.

Persone che operano per l'ente:

Nel seguente prospetto è indicato il numero medio dei dipendenti, ripartito per categoria e calcolato considerando la media giornaliera.

| | | N. OCCUPATI TOTALI |
|----------------------------------|-----------------------|--------------------|
| PERSONALE DI LABORATORIO-RICERCA | FONDAZIONE TETTAMANTI | 22 |
| | VERRI | 4 |
| | STATISTICA | 2 |
| | LIBERI PROFESSIONISTI | 2 |
| | | 30 |
| PERSONALE DI SUPPORTO | FONDAZIONE TETTAMANTI | 1 |
| | LIBERI PROFESSIONISTI | 1 |
| | | 2 |
| DIRETTORE SCIENTIFICO | FONDAZIONE TETTAMANTI | 1 |
| PERSONALE AMMINISTRATIVO | FONDAZIONE TETTAMANTI | 3 |
| TOTALE GENERALE | | 36 |

Obiettivi e attività:

L'evoluzione della sperimentazione: il progetto IRCCS

Al fine di poter stabilizzare il percorso di sperimentazione gestionale della Fondazione MBBM, di cui Fondazione Tettamanti è socio fondatore promotore, nel corso del mese di luglio 2019, a seguito di colloqui intercorsi tra la Regione Lombardia e il Ministero della Salute, si fa forte la possibilità che venga perseguito il progetto di riconoscimento di struttura IRCCS, insieme all'ospedale di Monza.

Parte fondamentale all'interno di questo progetto è della Fondazione Tettamanti, che con il suo Centro di ricerca, unico e direttamente collegato all'attività clinica, qualifica e innalza il livello della cura, oltre che garantisce un apporto significativo e rilevante all'interno di tutto l'ospedale per quanto concerne l'attività di ricerca e di pubblicazioni scientifiche.

Per tale motivo viene chiesto fin dall'inizio del percorso che anche la Fondazione Tettamanti possa essere uno degli attori protagonisti del nuovo IRCCS.

Nei successivi mesi dell'anno si definiscono dei tavoli di lavoro per sviluppare insieme ad ASST di Monza strategie, raccogliere dati clinici e di ricerca, al fine di finalizzare questa richiesta.

Di seguito si ripercorrono i principali step del progetto:

- Il percorso è stato avviato a metà del 2019 ed ha previsto una prima fase di studio di fattibilità presentato informalmente dal DG Welfare, Luigi Cajazzo e dal Direttore della ASST di Monza al Ministero ad agosto 2019.
- Si sottolinea che lo studio è realizzato tramite la **proficua collaborazione** di ASST Monza, FMBBM, Università Bicocca di Milano - i tre soggetti portanti del progetto - e della Regione Lombardia.
- In data 19 novembre 2019, in base a tale studio di fattibilità, il Direttore Generale richiede alla DG Welfare avvio dell'istanza di riconoscimento della ASST Monza come IRCCS ed in particolare come *Istituto di Tecnologie Biomediche Avanzate in Medicina di Precisione*;
- In data 9 dicembre 2019, la Giunta con deliberazione XI/2619 attribuisce mandato alla DG Welfare congiuntamente alla ATS della Brianza ed alla ASST di Monza di valutare tutti gli approfondimenti ritenuti necessari ai fini dell'avvio dell'iter di riconoscimento del carattere scientifico della ASST di Monza previsti dalla normativa 288/2003;
- In data 4 febbraio 2020 il Direttore Generale della ASST di Monza consegna alla DG welfare tutta la documentazione analitica richiesta ai fini del riconoscimento dalla normativa 288/2003 predisposta dal gruppo di lavoro delle tre entità
- inviato alla DG Welfare in data 3/8/2020 il **Protocollo d'Intesa, tra ASST Monza, Fondazione MBBM e Fondazione Tettamanti**; il protocollo di intesa sancisce l'intenzione dei soggetti portatori di interesse della volontà di costituire un IRCCS.
- **In data 14/9/2020 la Giunta Regionale, con delibera n. XI/3564**, avvia il percorso di trasformazione in IRCCS con invio al Ministero della Salute di tutta la documentazione tecnica inerente il progetto.
- Viene istituito dal Direttore Generale di ASST dott. Alparone un gruppo di lavoro, suddiviso per tematiche (cliniche, ricerca, gestionali..) che vede la partecipazione di Ospedale, Fondazione e Università
- In data 30/11/2020 si tiene il primo incontro (tramite videoconferenza) del gruppo di lavoro con il Ministero (dott.ssa Luciani e dott. Guglielmi): durante questo incontro il Ministero chiede una revisione relativamente all'oggetto dell'istanza e una più dettagliata descrizione della collaborazione e dei presupposti giuridici dei soggetti che intervengono nel riconoscimento
- Il gruppo di lavoro riorienta la scelta nell'ambito clinico scegliendo come aree principali le **Malattie Metaboliche e l'Oncologia**; tale lavoro viene presentato all'Assessore Gallera

- In data 22/12/2020 il Direttore Alparone invia alla dott.ssa Luciani del Ministero i documenti clinici sottoposti a revisione e la documentazione completa inerente gli aspetti gestionali
- In data 2/3/2021 si tiene il secondo incontro (tramite videoconferenza) del gruppo di lavoro con il Ministero (dott. Leonardi, dott.ssa Luciani e dott. Guglielmi), durante il quale il Ministero avalla la revisione inviata dal DG Alparone sia per quanto concerne la ripermimetrazione delle attività cliniche (oncologia e malattie rare) sia per quanto concerne la governance ipotizzata tramite la trasformazione dell'ospedale di Monza in fondazione di diritto pubblico, **i cui soci portatori di interessi originari sono Fondazione MBBM e Fondazione Tettamanti**. In particolare il dott. Leonardi chiede un'accelerazione rispetto alla tempistica di creazione della nuova fondazione, la quale non avrà necessità di dimostrare i tre anni di operatività, in quanto la connessione tra ospedale e fondazioni è già in essere da oltre un decennio tramite il meccanismo della sperimentazione gestionale.
- In data 30/4 viene inviata dal Direttore Alparone alla Direzione Generale Welfare di RL, all'attenzione del dott. Cozzoli, la bozza di statuto della nuova fondazione IRCCS e la bozza della Convenzione quadro tra ASST Monza, Fondazione MBBM e Fondazione Tettamanti
- In data 9/6 Regione Lombardia, nella figura del dott. Marco Cozzoli, Affari Generali della DG Welfare, è stata inviata la bozza di statuto della nuova fondazione IRCCS al dott. Leonardi del Ministero competente in materia di salute, con il quale è stata fissata una TC di confronto in data 17 giugno.
- Nel corso degli ultimi giorni del mese di giugno sono in atto incontri tramite TC con Ministero e Regione Lombardia per recepire tutte le osservazioni e finalizzare il documento.

Definizione del perimetro clinico- scientifico: Area di Riconoscimento Malattie rare -Oncologia

Con i più recenti progressi nelle conoscenze e nella terapia delle malattie complesse, il miglioramento dell'assistenza al malato (adulto e bambino) deve prevedere l'integrazione tra le diverse discipline cliniche e di laboratorio coinvolte nei processi diagnostici e terapeutici, nell'ottica della medicina personalizzata.

Il punto di partenza di questo cambiamento è certamente rappresentato dallo sviluppo ed utilizzo di tecnologie biomediche volte a caratterizzare la malattia nel singolo soggetto. Di queste fanno parte le "**Omics**" ovvero tutte le tecniche che studiano diversi aspetti biomolecolari della cellula, che meglio permettono una comprensione totale della malattia del singolo individuo. Non basta studiare i geni, ma integrarli con il loro funzionamento nell'organismo e quanto gli eventi esterni possono influenzare lo stesso genoma. Ancora ne fanno parte l'**imaging** e le **terapie innovative** (cellulari e geniche) che aprono nuove opportunità per la ricerca clinica su biomarcatori e terapie mirate.

Un secondo punto è la necessità di sviluppare nuovi disegni di studio e modalità di analisi dei dati per valutare l'efficacia clinica degli interventi medici integrando dati complessi ("**big data**").

Gli ambiti della medicina che hanno maggiormente stimolato lo sviluppo dell'approccio della medicina di precisione sono stati le malattie rare e l'oncologia.

A partire da queste premesse nasce la proposta di IRCCS-San Gerardo indicando come Aree di

Riconoscimento: Malattie rare (adulto e Pediatria) -Oncologia (adulto e Pediatria) che si svilupperà secondo tre linee principali di ricerca: 1. Genetica e malattie rare nell'adulto e in Pediatria; 2. Onco-ematologia in Pediatria; 3. Ricerca clinica e traslazionale in Ematologia e Oncologia medica e chirurgica dell'adulto.

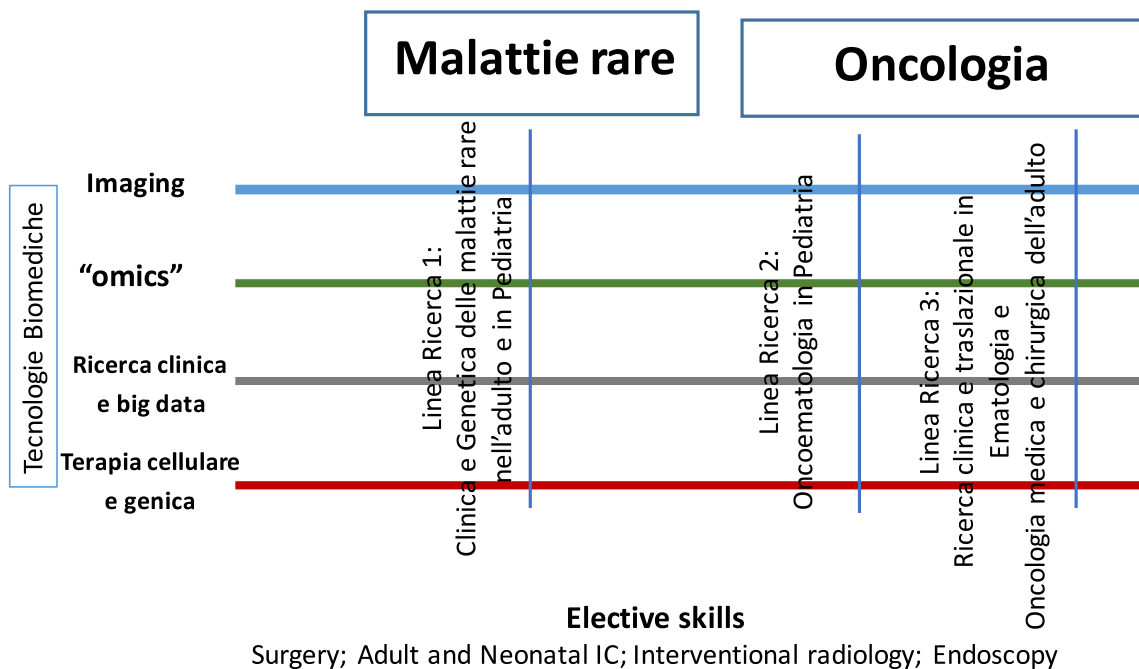
La linea di ricerca sulle malattie rare si propone lo studio dei meccanismi biomolecolari e lo sviluppo di terapie innovative in ambito preclinico e clinico delle malattie genetiche sia ad esordio in età pediatrica che dell'adulto. In tale contesto l'Ospedale San Gerardo/FMBBM è tra le prime strutture in Lombardia per numero di diagnosi di malattie rare. Ed in linea con tale attività clinica si colloca il riconoscimento come centro di "European reference Center-ERN e che sono: **ERN Cranio** (malformazioni cranio facciali su base genetica), **EuroBlooNet** (malattie ematologiche rare), **Rare-Liver** (malattie del fegato), **MetabERN** (Malattie metaboliche congenite).

La linea di ricerca in oncoematologia in Pediatria (ERN PaedCan) è rivolta alla comprensione dei meccanismi bio/molecolari della trasformazione leucemica e allo sviluppo ed applicazione di **protocolli diagnostici e terapeutici avanzati** (da studi "early phase" a clinical trial per la ottimizzazione delle cure) per il trattamento delle leucemie e linfomi in pediatria a livello nazionale ed internazionale. In particolare nell'applicazione di **tecnologie biomediche** quali **tecniche di genomica** per l'identificazione del profilo genetico del singolo paziente e sviluppo di strategie innovative terapeutiche, inclusa la **terapia cellulare e genica** delle leucemie. Tutto ciò è reso possibile dal collocamento del Centro di ricerca della Fondazione Tettamanti (dedicato alla ricerca sulle leucemie ed emopatie infantili) e da una delle prime Cell Factory autorizzate da AIFA in Italia nel 2007 e di recente (2018) anche per la manipolazione genetica non virale ad uso terapeutico.

La linea di ricerca clinica e traslazionale in Ematologia e Oncologia medica e chirurgica dell'adulto si propone di coniugare **tecnologie biomediche avanzate**, quali le tecniche diagnostiche basate su indagini biomolecolari e di imaging in diversi tipi di tumori, con approcci innovativi di trattamento e di disegno di studi (da "early phase" a clinical trial per la ottimizzazione delle cure) per favorire una personalizzazione delle cure ed una gestione sempre più appropriata delle risorse. Si fonda sulla presenza di centri e laboratori in collaborazione con Università finalizzati allo sviluppo di metodi di analisi "intelligenti" (es Bicro e B4) ed allo sviluppo preclinico di biomarcatori di malattia (ad es Tecnomed).

IRCCS San Gerardo-Monza

Area di Riconoscimento
Malattie rare -Oncologia



Definizione del percorso gestionale

Il nesso giuridico che lega i soggetti che hanno presentato istanza per il riconoscimento "IRCCS" è costituito dal progetto di sperimentazione gestionale denominato "Monza e Brianza per il bambino e la sua mamma", relativo alla realizzazione di una struttura autonoma, gestita da una Fondazione di partecipazione, i cui Fondatori Promotori sono il "Comitato Maria Letizia Verga per lo studio e la cura della leucemia del bambino ONLUS", la "Fondazione Matilde Tettamanti e Menotti De Marchi" e l'Azienda Ospedaliera "Ospedale S. Gerardo dei Tintori di Monza", avente ad oggetto le unità operative di Pediatria e Ostetricia (Cliniche Universitarie) e Neonatologia e Terapia intensiva neonatale (reparto ospedaliero).

La legge regionale sulle sperimentazioni gestionali prevede che, al termine della sperimentazione, prevista per la Fondazione MBBM il **31.12.2021**, sulla base degli esiti positivi della stessa, la Giunta regionale possa autorizzarne la stabilizzazione, procedendo alla definitiva autorizzazione, all'accreditamento e alla contrattualizzazione del soggetto gestore o, in caso contrario, dichiararne la cessazione.

In tale contesto, la Giunta Regionale della Lombardia con **D.G.R. n. 3564 del 14/09/2020** – stante l'approssimarsi della conclusione della sperimentazione gestionale in corso e il carattere di eccellenza non solo locale ma anche nazionale (ed europea) da questa raggiunto nel campo della cura e ricerca scientifica in favore di pazienti pediatrici, donne in gravidanza e neonati - ne ha definito l'evoluzione (e stabilizzazione) in quella che sarà una fondazione di diritto pubblico costituita da parte dell'Ospedale San Gerardo di Monza ai sensi dell'art. 13, comma 2, del D. Lgs. n. 288/2003, nella quale – oltre agli enti fondatori c.d. "istituzionali" di cui all'art. 2, c. 2, del D. Lgs. n. 288/2003 – saranno presenti, in qualità di soggetti rappresentativi degli interessi originari, per l'appunto la Fondazione Monza e Brianza per il Bambino e la sua Mamma Onlus («**Fondazione MBBM**») e dalla Fondazione Matilde Tettamanti Menotti De Marchi Onlus («**Fondazione Tettamanti**»), ai fini del riconoscimento IRCCS.

La nuova fondazione di diritto pubblico sarà, dunque, chiamata ad operare - in continuità con l'esperienza della sperimentazione gestionale in essere - la propria attività sotto la nuova forma dell'IRCCS, con la possibilità di sfruttare al massimo le attuali e future sinergie, così come fissato nel Protocollo di Intesa sottoscritto tra le parti in data 2/08/2020 e nella predetta D.G.R. n. 3564 del 14/09/2020.

Nell'istanza per il riconoscimento di IRCCS inoltrata al Ministero è stata individuata la (nuova) fondazione di diritto pubblico quale soggetto giuridico deputato al riconoscimento IRCCS, facendo leva sui requisiti di cui all'art. 13, comma 3, del D. Lgs. n. 288/2003 vantati dall'Ospedale San Gerardo di Monza e dalle Fondazioni MBBM e Tettamanti in forza della forte cooperazione sinergica – di natura clinica, assistenziale ed organizzativa - maturata (nell'ambito della sperimentazione gestionale attualmente in essere) per un periodo ben più ampio rispetto al minimo triennale richiesto e corrispondente addirittura a più di un decennio di comune attività. L'Istituto di cui si chiede il riconoscimento di IRCCS – in coerenza ai contenuti della relativa istanza e sulla scorta di altre e pregresse esperienze in tema di istituti di ricovero e cura a carattere scientifico opererà dunque attraverso una stretta ed organica cooperazione sinergica di natura clinica ed organizzativa tra l'Ospedale San Gerardo e le Fondazioni MBBM e Tettamanti.

L'Ospedale San Gerardo di Monza e le Fondazioni MBBM e Tettamanti, in continuità con la sperimentazione gestionale in essere e, soprattutto, in stretta aderenza con gli elementi posti alla base dell'istanza di riconoscimento di IRCCS, sono chiamati a sottoscrivere appositi atti di convenzionamento – la cui vincolatività sarà da farsi risalire già alla data di sottoscrizione dei medesimi e la cui efficacia sarà invece sospensivamente condizionata all'avvenuto riconoscimento di IRCCS – volti a definire nell'ambito della fondazione di diritto pubblico divenuta IRCCS:

- le modalità attuative di trasferimento delle unità che allo stato organizzano ed erogano l'attività assistenziale e di ricerca e delle relative risorse strutturali e umane a supporto delle linee di ricerca che definiscono gli ambiti del riconoscimento richiesto,
- la regolamentazione dei precisi compiti operativi dei diversi attori in causa.

Lo schema organizzativo del futuro IRCCS, da svilupparsi in coerenza con l'impostazione della relativa istanza, non prevede una integrazione strutturale della Fondazione MBBM e della Fondazione Tettamanti nell'IRCCS. Le Fondazioni continueranno, infatti, ad esistere come soggetti autonomi e parteciperanno all'IRCCS come portatori di interessi originari. In tale veste, esse saranno chiamate a svolgere la propria attività in funzione del conseguimento degli obiettivi di assistenza sanitaria e di ricerca propri della fondazione IRCCS, secondo le forme e le concrete modalità che troveranno compiuta regolazione negli adottandi strumenti convenzionali.

Nel corso dei primi mesi del 2021 è stata predisposta la Convenzione quadro che regolerà i rapporti tra la nuova Fondazione IRCCS e le Fondazioni MBBM e Tettamanti.

All'interno del documento trovano applicazione i seguenti principi:

- la Fondazione MBBM e la Fondazione Tettamanti svolgeranno l'attività di propria pertinenza in autonomia, pur nel rispetto degli indirizzi vincolanti dati dal Consiglio di Amministrazione, così come attuati, secondo le rispettive competenze, dal Direttore Generale e dal Direttore Scientifico della Fondazione IRCCS;
- l'attività della Fondazione MBBM sarà svolta dietro il pagamento di un corrispettivo a corpo e/o misura, congruo e rispettoso del principio del *cost plus fee*, così come definito di volta in volta nei pertinenti atti attuativi alla presente Convenzione Quadro. Nella definizione dell'anzidetto corrispettivo potrà essere prevista anche una parte variabile legata al raggiungimento degli obiettivi stabiliti dai competenti organi direttivi della Fondazione IRCCS;

- i) con riguardo, invece, alle aree di attività svolte direttamente dalla Fondazione IRCCS e prima eseguite da Fondazione MBBM/Fondazione Tettamanti, saranno adottati uno o più atti attuativi alla presente Convezione Quadro nei quali, nel rispetto dei principi di Legge, prevedere il conferimento dei mezzi e del know-how oggi in capo a Fondazione MBBM/Fondazione Tettamanti oltre che il distacco del personale, oggi da questi impiegato in dette attività, secondo i termini e le condizioni definite di volta in volta nei pertinenti atti attuativi alla presente Convezione Quadro e, comunque, in forme compatibili con la disciplina inerente il finanziamento degli IRCCS.
- ii) l'attribuzione alla Fondazione MBBM e alla Fondazione Tettamanti di responsabilità professionale in materia clinico organizzativa e responsabilità di tipo gestionale delle risorse assegnate alla U.O.C. Clinica pediatrica - Dipartimento del bambino complesso. All'interno di tale Dipartimento si collocheranno le seguenti unità operative:
- U.O. pediatria;
 - U.O. ematologia pediatrica;
 - U.O. Centro trapianti midollo;
 - U.O. DH ematologico-pediatrico;
 - Attività Ambulatoriale ad Alta Complessità Assistenziale;
 - SMeL Specializzato c/o U.O. di Ricovero e Cura - 1 - M Tettamanti.
- iii) la predetta autonomia, come avviene per la gestione autonoma di una struttura dipartimentale prevista nel POAS aziendale, si sostanzierà in via prioritaria nei seguenti principali elementi:
- realizzazione degli obiettivi e degli indirizzi vincolanti dati dal Consiglio di Amministrazione per come attuati, secondo le rispettive competenze, dal Direttore Generale e dal Direttore Scientifico della Fondazione IRCCS;
 - valutazione e verifica della qualità dell'assistenza e delle prestazioni erogate;
 - ottimizzazione e gestione dell'uso delle risorse;
 - promozione di nuove attività e/o nuovi modelli operativi nel settore di competenza.
- iv) in particolare, la Fondazione MBBM e la Fondazione Tettamanti, nell'ambito di tale autonomia, si assumeranno ciascuno per quanto di propria competenza gli oneri relativi:
- alla gestione Centro MLV e allo sviluppo tecnologico;
 - alla gestione del personale relativo alla Clinica Pediatrica e al laboratorio "Smell Tettamanti";
 - alla gestione unità di ricerca clinica di fase I e II;
 - al controllo di gestione, assistenza tecnica e informatica;
 - alla gestione del Centro di ricerca Tettamanti;
 - alla gestione del personale relativo al Centro di ricerca e al "Cell Factory S. Verri";

- ai progetti R&D e progetti di ricerca pediatrici del Centro di ricerca Tettamanti e del “*Cell Factory S. Verri*”;
- alle attività correlate di supporto al bambino e alla sua famiglia (assistenza sociale e psicologica, *sport therapy*, etc.);

Tale Convenzione, discussa e condivisa in diversi incontri tenutisi nel mese di aprile 2021 con la direzione di ASST è stata trasmessa in data 30 aprile alla Direzione Generale Welfare di Regione Lombardia.

In tale data è stata trasmessa dalla Direzione di ASST anche la bozza di Statuto della nuova costituenda Fondazione IRCCS.

Attività di ricerca

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. E' in fase di completamento l'analisi di espressione (*collaborazione con S. Bresolin, Padova*) per poi inviare il manoscritto per pubblicazione.

Lo studio prosegue con lo 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.

Il report scientifico conclusivo è stato predisposto ed è in fase di revisione interna prima di inviarlo per pubblicazione.

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 pediatrici 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.

Sono stati completati studi in vitro ed in vivo che dimostrano l'efficacia di nuovi inibitori tirosin chinasi in combinazione con farmaci tradizionali.

Il report conclusivo è in fase di elaborazione per la pubblicazione scientifica.

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, e nella leucemia nel sottogruppo con riarrangiamento del gene MLL; nella AML è coinvolto nella proliferazione cellulare, differenziazione e mantenimento del pool di cellule staminali. In uno studio precedente MSI2 è emerso come bersaglio di BRD4 nella ALL infant MLL-AF4+, suggerendone un ruolo nel sostenere la ALL MLLr ed essere coinvolto nella risposta al trattamento.

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

Utilizzando l'editing del genoma CRISPR/CAS9 abbiamo generato la linea cellulare ALL SEM (MLL-AF4+) difettiva per MSI2. Mediante RNA-immunoprecipitazione (RIP-chip) sono stati identificati bersagli diretti di MSI2, inclusi geni candidati di particolare interesse, in quanto coinvolti in proliferazione tumorale, resistenza ai farmaci, metabolismo cellulare e risposta allo stress. In vitro, la mancanza di MSI2 influisce sulla proliferazione delle cellule ALL MLLr. Inoltre, in a modello murino di xenotrapianto in vivo, le cellule prive di espressione di MSI2 hanno una ridotta capacità di iniziare la leucemia e topi trapiantati con cellule senza MSI2 mostrano un carico di malattia inferiore e sopravvivenza prolungata.

Gli studi proseguono, anche in collaborazione con la Dr. S. Bresolin (Università di Padova, Italia) e la Dr.ssa Kara Davis (Stanford, USA). E' in fase di discussione interna la richiesta di un finanziamento europeo ERC Synergy con i collaboratori di Olanda, Spagna e UK,

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 (*Dr. I. Sánchez-García, Salamanca, ES e 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 eradicarle 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.

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 altro progetto), a seguire le altre malattie ematologiche e non.

B. 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.

C. 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' in fase di preparazione il report scientifico per pubblicazione.

D. 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*).

Abbiamo identificato varianti dei geni delle coesine in pazienti LAL, e stiamo procedendo con l'analisi funzionale a partire dalla linea linfoblastoide generata da un paziente portatore di variante. Dati preliminari indicano alterazioni del ciclo cellulare e minore capacità di riparare danni del DNA (fosforilazione dell'Istone

H2A e conta di scambi tra cromatidi fratelli) (*collaborazione con J.Hauer, Dresda, DE, E.Erba, Mario Negri, Milano, IT e P.Bonizzoni, Unimib*)

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 prematuro 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 DADA2 senza leucemia T-LGL.

Abbiamo caratterizzato un paziente fenotipo atipico dovuto alla duplice diagnosi molecolare di sindrome linfoproliferativa autoimmune con una variante somatica in eterozigosi del gene FAS e distrofia muscolare di Becker, con delezione in emizigosi del gene DMD.

Infine, abbiamo caratterizzato il genotipo di una bambina di 8 anni con trombocitopenia autoimmune, evoluta verso un fenotipo combinato di immunodeficienza con infezioni ricorrenti, infezione persistente da EBV e linfoproliferazione. Sono state caratterizzate due nuove varianti (una delezione e un codone di stop prematuro), con conseguente espressione di DOCK8 notevolmente ridotta, ma non assente per reversione somatica identificata nelle cellule T. Il rilievo di colangite sclerosante ha indicato che la funzione ipomorfica e la reversione somatica di DOCK8 possono ritardare la progressione della malattia ma non necessariamente prevenire gravi complicanze.

L'Unità di Genetica della Leucemia Pediatrica, diretta dal Dr.Cazzaniga è composta da 3 staff scientists (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, 2020-2021), 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 (Ricerca della Fondazione Tettamanti) è focalizzata all'identificazione dei segnali derivati dallo stroma che guidano il mantenimento, l'evoluzione nonché la

chemioprotezione della leucemia, al fine di scoprire nuovi 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:

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

i) il 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. Abbiamo analizzato il contenuto di tali vescicole in termini espressione di miRNA ed abbiamo dimostrato come il miR-491-5p e miR-1236-3p aumentano la loro espressione a seguito della stimolazione con Activin A. Mentre il miR-1236-3p è stato dimostrato essere associato con la promozione della motilità cellulare e proprietà invasive, il miRNA 491-5p è associato alla chemioresistenza. Inoltre stiamo analizzato il contenuto proteico delle EV, mediante spettrometria di massa in collaborazione, le analisi sono tutt'ora in corso (Prof. Magni dell'università Milano-Bicocca); ii) il ruolo potenziale di ActivinA nella chemioprotezione delle cellule leucemiche. Abbiamo dimostrato il potenziale effetto chemioprotettivo di ActivinA, che rende le linee leucemiche resistenti all'Asparaginasi e al Desametasone, due farmaci chemioterapici utilizzati negli attuali protocolli di BCP-ALL. È interessante notare come, utilizzando un bloccante di ActivinA, si osserva una significativa riduzione della vitalità nelle cellule stimulate con tale molecola trattate sia con ASNase che con desametasone, dimostrando così che la chemioprotezione potrebbe essere ripristinata dal blocco di ActivinA; iii) la capacità di ActivinA di promuovere l'ingresso delle cellule leucemiche nel CNS e di alterare il microambiente cerebrale mediante l'utilizzo di fettine organotipiche cerebrali (in collaborazione con la Dott.ssa Zanier, Istituto Mario Negri) ed analisi della espressione, genica, proteica e microscopia confocale della microglia.

B) Indagare i cambiamenti metabolici all'interno della nicchia leucemica ed in presenza di ActivinA.

I meccanismi alla base della protezione metabolica delle cellule leucemiche da parte delle cellule mesenchimali stromali (MSC) vengono analizzati mediante 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 stimulate con le cellule leucemiche si 'convertono' al fine di secernere l'asparagina (Asn), aumentare l'espressione del trasportatore di membrana di tale aminoacido (SNAT5) e di un'enzima (glutamina sintasi) fornendo un microambiente stromale favorevole per la sopravvivenza delle cellule leucemiche trattate con asparinasi. Studi futuri saranno necessari per bloccare questa via di protezione, mediante inibitori specifici.

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

A tal fine utilizzeremo l'ortologo 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 è stata testata *in vitro* con successo ed è attualmente in studio *in vivo* in combinazione con due diversi approcci anti-leucemici, la chemioterapia standard e le cellule CARCIK-CD19, utilizzate nel nostro centro.

D) Studio della componente macrofagica protumorale nella nicchia leucemica e suo bersaglio mediante la generazione di recettori chimerici (CAR)

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, abbiamo studiato il coinvolgimento dei compartimenti dei monociti e dei macrofagi nella patologia della BCP-ALL. Le analisi immunoistochimiche hanno mostrato che i macrofagi presenti nella nicchia leucemica presentano prevalentemente i marcatori dei macrofagi M2 pro-tumorali, CD163 e CD206 (*in collaborazione con il gruppo del Prof. Mantovani-Humanitas University, Milano*). Partendo da tali dati stiamo generando recettori chimerici per armare le cellule CIK: le CARCIK-CD19 colpiranno quindi direttamente la cellula leucemica e, con un secondo CAR, il macrofago pro-tumorale che non sarà più in grado di “proteggere” le cellule leucemiche che rimarranno eventualmente presenti.

6. Studio dell'asse Chemerina/Chem R23 *in vivo* in un modello murino di GVHD acuta e del suo eventuale impatto nei pazienti pediatrici sottoposti a trapianto allogenico di cellule staminali ematopoietico (HSCT) (Dr.ssa G.D'Amico)

L'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^{-/-}. Molto importante, la terapia adottiva di monociti WT in topi tChemR23^{-/-} è in grado di recuperare il danno intestinale a livelli comparabili con gli animali tWT. Studi futuri saranno necessari per comprendere se i macrofagi richiamati possano intervenire nella protezione e rigenerazione dell'epitelio intestinale. Inoltre, l'analisi di 70 pazienti pediatrici sottoposti a HSCT mostra livelli più alti nel plasma di chemerina al momento o nella prima settimana successiva al trapianto, che risultano predittivi lo sviluppo della GvHD. Sarà interessante valutare se chemerina potrà essere utilizzata come marcatore precoce di malattia nella pratica clinica di questa invalidante malattia, mediante l'analisi di una più ampia coorte di pazienti.

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 ha sviluppato un filone di ricerca sulla sindrome 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”, promosso da EU per favorire il network tra i Centri di Eccellenza in Europa sulle 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, a causa di un difetto nelle proprietà angiogeniche in risposta a stimoli angiogenici. Tale difetto potrebbe svolgere un ruolo fondamentale nell'insufficienza vascolare, e nella neutropenia dei pazienti affetti da SDS. Di notevole interesse il gruppo della Dott.ssa D'Amico ha inoltre dimostrato come una molecola ad attività anti-infiammatoria (DMSO) sia in grado di revertire il difetto angiogenico delle MSC ottenute sia dai pazienti SDS. Attualmente stiamo analizzando il meccanismo di azione di tale farmaco. Questi dati e quelli precedentemente pubblicati dal gruppo, indicano come le SDS-MSC potrebbero giocare un ruolo fondamentale nel difetto vascolare e nella neutropenia dei pazienti affetti da SDS, ma tale difetto potrebbe essere corretto utilizzando farmaci ad attività anti-infiammatoria.
- 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)*

L'Unità della Dr.ssa D'Amico è costituita da una staff scientist (Erica Dander), da 4 PhD Student (Alessandra Fallati, Noemi di Marzo, Clarissa Gervasoni, Eugenia Licari), da una borsista laureata in Biotecnologie (Rita Starace) e da una studentessa Biotecnologie (Alice Giussani).

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.ssa 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 ½ avvenuta in queste settimane (Ottobre, 2020) che si è avuta conferma di tale originalità.

Nel 2019 si è realizzato il merging tra Formula e Colmmune (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 Colmmune.

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. ha 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.

Sempre nella ricerca di un antigene bersaglio ideale per l'AML, la proteina TIM-3 è emersa come un nuovo attraente bersaglio selettivo delle cellule staminali leucemiche (LSC) promuovendone la sopravvivenza. Inoltre, essendo un inibitore di checkpoint immunitario, è stato scoperto che promuove l'esaurimento delle cellule T e l'espansione delle cellule soppressorie di derivazione mieloide e la differenziazione nei macrofagi associati al tumore. Queste caratteristiche suggeriscono che si potrebbe ottenere un duplice effetto bersagliando la proteina TIM-3: si colpirebbero, infatti, le LSC e, allo stesso tempo, si modulerebbe il microambiente tumorale immunosoppressivo. Considerando queste premesse, stiamo sviluppando cellule CAR "bi-specifiche", accoppiando il CD33.CAR a un CCR che riconosce TIM-3.

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 costrutto 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 cellule stromali mesenchimali 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. Conseguentemente, stiamo investigando il possibile coinvolgimento del Notch signalling in tale alterazione, dimostrando come il contatto diretto con linee cellulari o blasti di LMA, causa l'aumento di espressione nelle MSCs della Tissue Non-specific Alkaline Phosphatase (TNAP), marcatore dell'osteogenesi precoce, e la riduzione di espressione di osteocalcina (BGLAP) e osteopontina (SPP1), marcatori dell'osteogenesi tardiva. Nel complesso, i nostri risultati sembrano suggerire che il Notch signalling viene attivato dalle cellule di LMA nelle cellule mesenchimali stromali, inducendo dapprima l'osteogenesi precoce, ma a causa di un'anomala e costante over-attivazione, portando poi al blocco della completa maturazione ad osteoblasti. Come prospettiva futura è nostra intenzione indagare lo stato di attivazione del pathway di Notch nelle MSCs isolate da pazienti affetti da LMA, con lo scopo di verificarne l'influenza sull'osteogenesi.

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. Studio del processo di ossificazione e di un approccio di terapia genica neonatale nella mucopolisaccaridosi di tipo I (Dr.ssa M. Serafini)

La mucopolisaccaridosi di tipo I (MPSI) è una malattia genetica rara causata dalla carenza dell'enzima alfa-L-iduronidasi, che porta ad un accumulo progressivo di glicosamminoglicani in tutti gli organi e tessuti. I pazienti affetti presentano manifestazioni cliniche multisistemiche di gravità variabile, tra cui deformità scheletriche. Da studi condotti in modelli animali sembra che diversi fattori contribuiscano alle malformazioni dello scheletro tra cui un'alterazione nell'ossificazione della cartilagine. Per verificare se questo processo può essere alterato anche nei pazienti, abbiamo isolato dal loro midollo osseo cellule stromali mesenchimali. Queste cellule vengono differenziate in vitro in cartilagine immatura e ipertrofica e utilizzate in una raffinata modellistica in vivo che permette di riprodurre in maniera fisiologica il processo di ossificazione endocondrale. Attraverso analisi immuno-istologiche, biochimiche e molecolari ci prefiggiamo di capire quali anomalie vi siano a livello della condrogenesi e dell'ossificazione.

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 affetti da MPSI. Il progetto, in fase di svolgimento in collaborazione con il team del Prof. Aiuti A (Tiget, Ospedale San Raffaele), si prefigge di testare l'efficacia terapeutica del trapianto di cellule staminali ematopoietiche autologhe geneticamente modificate nel periodo neonatale. Utilizzando un modello murino della malattia, vogliamo dimostrare come l'utilizzo di un approccio di terapia genica, se effettuato in un'epoca estremamente precoce, possa migliorare le manifestazioni cliniche negli organi solitamente refrattari al trattamento corrente. In corso di valutazione, la riduzione della severità delle anomalie scheletriche e la diminuzione della neuroinfiammazione e delle anomalie metaboliche neuronali. Poiché attualmente ci sono opzioni terapeutiche limitate per i pazienti con MPS-I, i nostri risultati potranno fornire un ulteriore passo avanti nel trattamento di questa malattia rara. Questo progetto è svolto in collaborazione con la Prof.ssa Riminucci M (*Dipartimento di Anatomia Patologica, Policlinico Umberto I, Università La Sapienza, Roma*), con il Professor Shunji Tomatsu (*Hospital for Children di Wilmington, 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 (Dr.ssa M. Serafini/Progetto A. Menarini Biomarkers)

Questo progetto, svolto in collaborazione con la Prof.ssa Vergani (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. I dati scientifici prodotti sono stati oggetto di una recente pubblicazione ed il progetto sta evolvendo in un trial clinico multicentrico a livello nazionale, in cui sarà coinvolta l'Unità di Ostetricia diretta dalla Prof.ssa Vergani. Il progetto è stato 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 (staff scientist), dott.ssa Sarah Tettamanti (staff scientist), 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), dott.ssa Corinne Arsuffi (biotecnologa).

14. Studi Citometrici e 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 nel contesto 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 [3]. Tuttavia sebbene il CD19 sia espresso essenzialmente da tutti i casi di LLA-B alla diagnosi [4,5], si sono verificati casi di recidiva con perdita o ridotta espressione sulla superficie cellulare del CD19 [6-9].

Il pathway BAFF/BAFF-Receptor (BAFF-R) ha un ruolo nel supportare la sopravvivenza delle cellule LLA-B e nel contribuire alla resistenza alla terapia da parte del clone leucemico nel microambiente midollare [10]. Dati prodotti dal nostro laboratorio hanno dimostrato che BAFF-R è altamente espresso nei campioni diagnostici di 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 che mira al BAFF-R [11] e alla sua combinazione con l'approccio anti-CD19, dimostrando un'attività superiore anche nei confronti della leucemia recidivante LLA-B CD19-negativa. Tuttavia, vi è necessità di ottimizzare un costrutto BAFF-R di nuova generazione e di combinarlo con ulteriori target, vista l'eterogeneità di espressione nella LLA-B.

Allo scopo di generare un costrutti di nuova generazione, abbiamo clonato il CAR anti-il BAFF-R nel plasmide ricombinate PT4 e esperimenti preliminari di nucleofezione hanno dimostrato la sua espressione sulla superficie delle cellule trattate. Le cellule nucleofettate con il plasmide PT4 contenente il costrutto CAR anti-BAFF-R hanno mostrato una cinetica di espansione sovrapponibile a quella dei CAR anti-CD19 ma un'espressione del CAR anti-BAFF-R (a 21 giorni di coltura) inferiore all'atteso che ci hanno indotto a revisionare il costrutto per migliorarne l'espressione. Gli studi di citotossicità su modello di malattia rappresentato dalla linea cellulare di LLA-B NALM6 hanno mostrato per queste CARCIK un *killing* del 40% dopo 24 ore di coltura che è inferiore ad altri costrutti quali l'anti-CD19 CAR. Una possibile spiegazione per i bassi valori di killing può essere legata all'evidenza riscontrata in letteratura che l'espressione del BAFF-R venga regolata da parte di alcune metalloproteasi ed in particolare da ADAM10 e ADAM17, che andrebbero a "tagliare" il dominio extracellulare del BAFF-R impedendo in tal modo alle cellule CARCIK anti-BAFFR di individuare il target, ed espletare la loro funzione citotossica. A sostegno di questa ipotesi, risultati preliminari hanno mostrato un aumento dell'espressione di BAFF-R sulla superficie di linee cellulari di B-ALL (NALM6, REH, DAUDI, 697, SEM) e di linfoma B (RAJI) in coltura dopo trattamento con inibitori delle metallo-proteasi ADAM10/17 *in vitro*. Tali risultati dovranno essere ulteriormente validati e testati anche nell'ambito di esperimenti *in vitro* di citotossicità in presenza di tali inibitori.

Sempre nell'ottica di implementare nuove strategie di multi-targeting, abbiamo disegnato e clonato un costrutto CAR diretto contro l'antigene CD22, una molecola importante per la sopravvivenza e le funzioni dei linfociti B che viene espressa da blasti LLA-B. Dagli esperimenti *in vitro*, le cellule CARCIK CD22 hanno mostrato un'ottima cinetica di crescita con un *fold Increase* x150 in 20 giorni ed un'espressione del CAR a 21 giorni del 27-44%. A questi dati si sono poi affiancati gli incoraggianti risultati emersi dagli studi di citotossicità *in vitro* su modello di malattia rappresentato dalla linea cellulare di B-ALL NALM6 con un killing del 74% a 4h dalla co-coltura, sovrapponibile a quelli ottenuti con le CARCIK-CD19. Sulla base dei risultati ottenuti *in vitro*, abbiamo avviato esperimenti in modelli murini immunodeficienti trapiantati con la linea DAUDI e che hanno mostrato un'eccellente capacità di *killing* da parte delle cellule CARCIK-CD22 con assenza di malattia a 60 giorni (sia a livello di organi che di midollo osseo) e un'ottima espansione e persistenza delle CARCIK-CD22 anche a dosi inferiori a CARCIK-CD19. In parallelo all'eradicazione della malattia abbiamo dimostrato un prolungamento della sopravvivenza nel modello murino.

Da questi risultati siamo partiti per effettuare un primo passo verso la strategia di multi-targeting mediante la co-nucleofezione dei costrutti CD22 e CD19 in modo da ottenere una popolazione mista di CARCIK CD19 e CD22. Gli esperimenti sono tutt'ora in corso.

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

Un grande interesse è quello di identificare, all'interno del microambiente tumorale, quei fattori che influenzano l'attività e la potenza delle cellule anti-CD19 CAR T. La nicchia leucemica del midollo osseo supporta la persistenza leucemica e la resistenza ai farmaci. La dissezione del cross-talk tra le cellule

eterogenee del microambiente tumorale e le cellule immunitarie vicine viene perseguita nei campioni dei pazienti utilizzando approcci genomici e analisi delle singole cellule. A questo scopo, il profilo di espressione genica e l'immunomonitoraggio in citometria a flusso sono tecniche di scelta per fornire una migliore comprensione dell'efficacia e della sicurezza delle cellule CAR T. Attraverso lo studio del trascrittoma delle componenti midollari dei pazienti trattati con cellule anti-CD19 CAR T verranno identificati i percorsi di immuno-evasione sostenuti dalla nicchia leucemica del BM con l'obiettivo di promuovere approcci combinati che mirino ai meccanismi di resistenza. Tali analisi contribuiranno a rivelare diversi aspetti chiave relativi alla persistenza delle cellule CAR T in vivo, ai fattori del microambiente associati alla risposta dei pazienti, così come alla resistenza e agli effetti secondari che si verificano durante la terapia.

Per studiare l'interazione tra le cellule T anti-CD19 CAR e il microambiente della leucemia, l'analisi trascrizionale delle cellule da BM di pazienti trattati con anti-CD19 CAR T sarà eseguita per mezzo del sequenziamento dell'RNA di singole cellule con la piattaforma 10XGenomics Chromium e C1 Fluidigm.

I campioni di midollo osseo dei pazienti sono stati raccolti nei primi tempi (max 30-60 giorni) dopo l'infusione quando le cellule CAR T stabiliscono interazioni con il microambiente tumorale. Per identificare come le cellule CAR T sono influenzate dal microambiente del BM, le cellule T CD3+ comprese le cellule T CAR+ vengono sortate dal BM prima e dopo il trattamento. In parallelo, vengono analizzate cellule CAR T provenienti dal lotto di produzione. Contemporaneamente, per identificare i meccanismi di escape immunitaria del microambiente tumorale, non solo le cellule CD3+ ma anche le cellule CD45+CD3- vengono sortate dal BM post-trattamento, analizzate e confrontate con le cellule CD45+CD3- del BM del paziente corrispondente pre-trattamento.

Gli esperimenti sono stati condotti in collaborazione con il Prof. M. Pagani (IFOM, Milano) utilizzando campioni ricavati da pazienti trattati con cellule CARCIK-CD19 o trattati con cellule anti-CD19 CAR T commerciali. È stata realizzata una libreria di scRNAseq [Chromium Single Cell 5-library and V(D)J enrichment kit (10x Genomics)]. Inizialmente, abbiamo eseguito un esperimento di prova su campioni pre-infusione di un paziente trattato con CARCIK-CD19 per definire le procedure e l'analisi. In questo esperimento, abbiamo selezionato la popolazione CAR+ e CAR- dal prodotto cellulare CARCIK e le hCD45+CD3- e hCD45+CD3+ dal BM pre-infusione. Il numero di cellule totali scongelate era di 35×10^6 cellule e 10×10^6 cellule, rispettivamente. La conta cellulare e la vitalità dopo sorting sono stati sufficienti per procedere con lo scRNA-seq. L'esperimento di prova è stato eseguito per convalidare i protocolli per la preparazione dei campioni congelati e il sorting. Pertanto, ora i protocolli sono disponibili e sono stati recentemente condivisi con le altre unità del progetto INCAR. Un totale di quattro librerie di sequenziamento sono state generate utilizzando il Chromium Single Cell 5' Reagent Kit della 10x Genomics (v3.1). Inoltre, per tre delle quattro librerie di sequenziamento (con l'eccezione della componente CD45+CD3- dal BM) è stata tentata anche l'analisi della clonalità del TCR con il kit Chromium Single Cell Immune Profiling.

Rispetto all'analisi dei dati del sequenziamento, i duplicati non-PCR con barcode validi e identificatori molecolari unici (UMI) sono stati utilizzati per generare la matrice gene-barcode. Al fine di escludere le cellule di bassa qualità e i barcode che non sono correlati alle cellule, è stata calcolata la distribuzione dei geni rilevati per cellula e sono state rimosse le cellule con meno di 200 geni. Sono state inoltre rimosse le cellule con più del 10% dei trascritti provenienti da geni mitocondriali e ribosomiali. I dati sono stati quindi normalizzati in base all'espressione totale. Il processo di feature selection è stato eseguito al fine di ottenere una riduzione dimensionale iniziale e rimuovere il rumore mantenendo solo i geni altamente variabili. Per visualizzare i dati, la dimensionalità della matrice dei dati è stata ulteriormente ridotta per

proiettare le cellule nello spazio bidimensionale utilizzando principal component analysis (PCA) seguita da UMAP (uniform manifold approximation and projection).

Il controllo di qualità preliminare dei dati di sequenziamento ha evidenziato una qualità complessiva elevata per tutte le librerie, comprese quelle per la ricostruzione del TCR. Tutti i campioni dell'esperimento di prova hanno ottenuto un numero di cellule sequenziate più che sufficienti per la maggior parte delle analisi. Tutti gli altri parametri di controllo di qualità si sono dimostrati ottimali.

Le analisi iniziali eseguite sulla libreria CD45+CD3- derivata dal BM avevano lo scopo di identificare i blasti leucemici e distinguerli dai precursori sani delle cellule B. Abbiamo eseguito un'analisi non supervisionata che ha evidenziato sei diversi cluster. Due cluster minori sono stati annotati come cellule immunitarie residenti (monociti CD14+ e cellule NK G7+) mentre gli altri quattro sono stati identificati come cellule B (CD19+). All'interno dei cluster di cellule B, abbiamo valutato quali cluster avesse un'espressione genica più simile a una gene signature associata ai blasti leucemici. Questa analisi ci ha permesso di differenziare tra cluster di cellule maligne e cellule B normali.

Le library generate dal prodotto dell'infusione sono state analizzate anche per valutare se il trascritto del transgene CAR poteva essere identificato. A questo scopo, la sequenza del trascritto artificiale è stata aggiunta al genoma di riferimento prima di allineare le reads, permettendo così una quantificazione accurata del trascritto. Infatti abbiamo trovato che un'alta percentuale, vicina al 50%, di cellule CAR+ derivate da IP esprimeva il trascritto CAR, mentre era rilevabile solo in poche cellule (0,002%) del campione IP CAR-. Al fine di delineare la clonalità delle cellule T, la sequenza TCR è stata ricostruita nei campioni IP-CAR T+, IP-CAR T- e BM CD3+. La sequenza TCR è stata ricostruita per il ~95% delle cellule del set di dati IP-CART+. L'analisi è stata limitata ai clonotipi nella forma convenzionale $\alpha\beta$ per facilitare l'interpretazione. Il profilo clonale dei clonotipi selezionati mostra oligoclonalità con 751 cloni associati a più di una cellula. Il clonotipo più espanso rappresenta fino a 136 cellule. L'espansione clonale è paragonabile tra i campioni IP_CART+ e IP_CART- (stimolati) ma maggiore di B_CD3+ come previsto per la natura delle cellule probabilmente in resting phase nel BM.

Avendo dimostrato la fattibilità della procedura di sorting delle popolazioni, l'analisi RNA-seq a singola cellula e il workflow di analisi dei dati, abbiamo quindi analizzato un secondo campione di BM pre-infusione da un paziente pediatrico trattato con anti-CD19 CAR T (Novartis). Anche in questo caso, l'analisi dei dati di sequenziamento ha rivelato un numero di cellule adeguato, il superamento dei controlli qualità generali, del sequenziamento e del mapping. Come nel campione precedente, è stato possibile rivelare le diverse componenti del BM, i.e. monociti CD14+, cellule NK G7+, cellule maligne e cellule B normali.

Stiamo in questo momento aspettando i risultati dei sequenziamenti della library del primo paziente del BM post-infusione e delle library del secondo paziente del BM post-infusione e del prodotto cellulare. Anche l'esperimento di sorting del previsto terzo paziente è stato programmato.

Infine, ad integrazione e validazione degli esperimenti di single-cell RNAseq, abbiamo creato i modelli murini di xenograft, infondendo in topi immunodeficienti cellule del BM della recidiva dei pazienti da ora analizzati. A seconda dei fattori del microambiente e dei sottoinsiemi cellulari emersi dalle analisi a singole cellule, la convalida in vivo sarà effettuata nei modelli xenograft mediante inibizione con anticorpi, trasduzione e/o editing di popolazioni risultate rilevanti. Per studiare le interazioni tra il microambiente tumorale e le cellule T CAR in vivo, i topi NSG devono essere prima umanizzati. I topi NSG saranno irradiati in modo sub-letale e co-trapiantati con cellule HSC CD34+ umane e cellule leucemiche B-ALL da riceventi leucemici primari o secondari. Inoltre, partendo da un campione di midollo osseo alla recidiva, sono state

isolate e espanse le cellule mesenchimali stromali (MSC) del primo paziente analizzato in single-cell, sono state quindi congelate le MSC che verranno utilizzate per una co-coltura con i blasti del paziente stesso espansi attraverso *patient derived xenograft*.

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

Ad oggi, i fattori più importanti che influenzano l'esito e la durata della risposta del tumore dopo la terapia con cellule T CAR in clinica includono la capacità delle cellule T di espandersi e persistere dopo la somministrazione, alcuni fattori intrinseci di resistenza tumorale e la potenziale perdita o down-regolazione dell'antigene bersaglio. Al momento sono state individuate alcune variabili che possono avere un impatto sull'efficacia delle cellule T CAR: i) il disegno del costrutto CAR la singola catena nel frammento variabile (scFv) ed i domini costimolatori transmembrana; ii) tipo di vettori; iii) disegno dello studio (regime di condizionamento e dosi); iv) il processo di fabbricazione delle cellule CAR-T; v) criteri di ammissibilità e caratteristiche del paziente [12–16]. La citometria a flusso nella terapia con cellule CAR T viene utilizzata per valutare il fenotipo e la funzione delle cellule CAR T prodotte prima dell'infusione, l'attecchimento e il fenotipo delle cellule CAR T e il monitoraggio immunologico dopo il trattamento [17]. È stato dimostrato che i biomarcatori delle cellule CAR T possono essere studiati per prevedere la risposta del paziente all'immunoterapia e per costruire modelli prognostici, portando in definitiva a un approccio più personalizzato al trattamento [17-21].

Nell'ambito della nostra collaborazione con il progetto europeo INCAR (*in collaborazione con il Prof. Alberto Orfao, Salamanca*) abbiamo sviluppato pannelli di anticorpi specifici per determinare il profilo immunologico e funzionale di tutte le popolazioni cellulari misurabili durante il follow-up dei pazienti trattati con cellule CAR-T. Sono già stati definiti i protocolli standard di preparazione dei campioni e la strategia analitica dei dati citometrici ottenuti. Abbiamo convalidando il metodo su una parte dei campioni derivati dallo studio di fase I-IIa recentemente concluso. Inoltre la stessa piattaforma sarà impiegata prospetticamente nell'ambito di un imminente studio di fase II approvato dall'AIFA (Measurable residual disease driven strategy for one or two infusions of nonviral, transposon-manipulated CARCIK-CD19 cells. A Phase II study in pediatric and adult patients with relapsed/refractory B cell precursor ALL -BCP-ALL, EUDRACT number 2020-005025-85). Inoltre la piattaforma citometrica multiparametrica è stata utilizzata per caratterizzare in modo accurato l'immunofenotipo delle cellule CARCIK-CD19 pre-infusione. I parametri immunofenotipici delle cellule pre-infusione saranno messi in relazione con i parametri di follow-up post-infusione (ad es. persistenza delle cellule CAR, analisi clonalità inserzionale, misura della malattia minima residua, persistenza dell'aplasia delle cellule B ed il tipo e la durata della risposta). A questo scopo sono state utilizzate le cellule scongelate da 21 lotti di cellule CARCIK-CD19 prodotte nel contesto dello studio clinico CARCIK-CD19 recentemente chiuso [NCT03389035].

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

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' elevante 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. Lo studio è concluso con il reclutamento di 31 pazienti con JMML ed il manoscritto è in fase di scrittura per la pubblicazione su rivista scientifica.

16. Analisi di singole cellule in LLA T per lo studio del profilo di trasduzione del segnale e dei pathways associati a chemioresistenza

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

La leucemia linfoblastica acuta a cellule T (T-ALL) è un tumore aggressivo derivante da linfoblasti di origine a cellule T. Mentre la T-ALL rappresenta solo il 15% dell'infanzia e il 25% della ALL adulta, il 30% dei pazienti recidiva con un esito sfavorevole. È quindi urgentemente necessaria una terapia mirata di T-ALL pediatriche resistenti e ad alto rischio, insieme a strumenti di medicina di precisione che consentano di testare l'efficacia nei campioni dei pazienti. Inoltre, l'eterogeneità delle cellule leucemiche richiede la valutazione della risposta ai farmaci a livello di singola cellula. Abbiamo utilizzato la citometria di massa a livello di singola cellula per studiare le vie di trasduzione del segnale quali JAK-STAT, PI3K-AKT-mTOR e MEK-ERK in 16 campioni primari alla diagnosi e 5 campioni raccolti in occasione della recidiva. Le cellule sono state sottoposte a diversi trattamenti in vitro (IL-7 e l'inibitore BEZ-235, l'inibitore ruxolitinib, ed il dexametasone). Le cellule di T-ALL hanno mostrato iperattivazione delle vie PI3K-AKT-mTOR e MEK-ERK ed un aumento dei marcatori di proliferazione. Nei campioni con buona risposta agli steroidi in vivo è stata osservata una concomitante risposta in vitro del pathway di JAK-STAT dopo stimolazione con IL-7. Al contrario, i pazienti con scarsa risposta agli steroidi in vivo hanno risposto meglio all'inibizione di BEZ-235. I profili di risposta sono stati mantenuti anche nel campione della recidiva. In questo studio abbiamo dimostrato potenzialità della citometria di massa nella definizione accurata della trasduzione del segnale nelle T-ALL. Inoltre abbiamo identificato cluster distinti di pazienti T-ALL sensibili a IL-7 e BEZ-235, supportando l'ipotesi che le alterazioni nelle vie JAK-STAT e PI3K-AKT abbiano effetti reciprocamente esclusivi. I risultati di questo studio sono attualmente sottoposti alla rivista internazionale *Haematologica*.

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

Attualmente non sono disponibili trattamenti efficaci per i pazienti con T-ALL refrattari ai trattamenti standard o recidivanti dopo il trapianto di midollo osseo. Abbiamo testato un anticorpo monoclonale afucosilato (ahuUMG1) che riconosce un epitopo dell'antigene CD43 (UMG1) altamente espresso nelle cellule di T-ALL. L'espressione di UMG1 è stata valutata in immunistochemica (IHC) su un ampio pannello di tessuti normali (TMA) ma anche mediante citometria a flusso su sangue periferico e midollo osseo sia in soggetti sani sia in pazienti adulti e pediatriche con T-ALL. È stato generato un anticorpo monoclonale umanizzato diretto contro UMG1 in grado di esercitare una azione citotossica cellula-mediata (ADCC), e fagocitosi mediata (ADCP). È stata anche dimostrata una importante attività antitumorale *in vivo* in topi NSG contro sottocutaneo anche con xenotrapianti ortotopici di T-ALL umana. Lo sviluppo clinico di ahuUMG1 potrebbe rappresentare un valido approccio di immunoterapia nelle T-ALL resistenti. Lo studio è stato recentemente pubblicato sulla rivista *Journal for Immunotherapy of Cancer* (Caracciolo D, et al. *J Immunother Cancer* 2021;9:e002026. doi:10.1136/jitc-2020-002026).

L'Unità diretta dal Dr.G. Gaipa è costituita dalla Dr.ssa Magnani C.F., PhD Senior Post-doc; 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. Moretti A., MD, PhD student.

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.ssa S. Rigamonti, Dr. S. Palamini, coordinamento Dr.ssa G. Fazio)

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;
- 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 2020-2021 sono ben **22** i grant in corso che le diverse Agenzie Italiane ed Europee hanno assegnato su base competitiva alle ricerche di Fondazione Tettamanti (AIRC, Fondazione Cariplo, EU H2020, AISS, AIFA, Ministero Salute), oltre a 2 in attesa di decisione e 2 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, Interfant, EsPhALL, international Leukemia Tumor Board.

E. Pubblicazioni scientifiche del Centro Tettamanti (2020-2021)

Nel periodo 2020 e parte del 2021, sono stati prodotti e pubblicati **58 lavori scientifici su riviste internazionali** peer-reviewed (di cui viene allegato elenco).

Situazione economico-finanziaria:

Di seguito si riportano i principali aspetti di natura giuridica e gestionale che hanno riguardato la Fondazione nel corso del 2020 e che hanno impatto sulla situazione economico finanziaria della stessa:

1. Analisi contesto ed evoluzione - Fondazione MBBM e Fondazione Tettamanti

Nel contesto sopra descritto relativo al progetto di trasformazione in IRCCS, la direzione di Fondazione MBBM ha manifestato l'esigenza di ricevere un supporto per l'analisi e valutazione dei possibili scenari alternativi di evoluzione della sperimentazione gestionale nonché per la determinazione di un range di valori delle attività materiali e immateriali che dovessero confluire nell'ambito del nuovo IRCCS (o delle soluzioni evolutive alternative).

Pertanto, a seguito di valutazione su alcune alternative possibile, in data 21 gennaio 2021 il CDA di Fondazione MBBM ha deliberato di affidare mandato alla società PWC per lo svolgimento del seguente

incarico:

Fase 1 - Analisi del contesto e della situazione attuale

Fase 2 – Supporto all’analisi degli scenari alternativi e predisposizione del Piano pluriennale

Fase 3 – Analisi valutative illustrative

Nel corso dei primi mesi del 2021 si sono tenute diverse riunioni per poter confrontarsi relativamente alla principali tematiche economiche/organizzative e di sviluppo, confrontandosi con i responsabili amministrativi e sanitari della Fondazione. Nel corso del prossimo mese di luglio si prevede la prima release del documento finale, che sarà presentato al CDA.

2. deliberazione n. XI/1205 del 04/02/2019;

Tale deliberazione, per la quale fondazione Tettamanti in qualità di socio privato della Fondazione MBBM ha presentato ricorso al TAR è stato oggetto di revisione nella DGR XI/4132 del 21/12/2021, che stabilisce la rimodulazione delle condizioni poste al punto 2 della DGR XI/1205/2019 con prescrizioni/raccomandazioni, come di seguito indicato:

- ✓ **mantenere l’obbligo di pareggio di bilancio** , posto a garanzia del percorso di risanamento, in buona parte realizzato sul fronte dei costi e di rientro del debito verso ASST, la cui osservanza - tenuto conto che sul 2019 incidono allo stato attuale elementi sub iudice – **è al momento sospesa** in quanto la verifica dello stesso è soggetta all’esito della giurisdizione amministrativa; si raccomanda che il Bilancio di previsione 2021, in corso approvazione da parte del CdA della Fondazione, presenti un risultato positivo (utile) confermando la previsione del PEF presentato;
- ✓ **sospendere l’obbligo di ripiano obbligatorio da parte dei soci fondatori privati**, in attesa dell’esito del procedimento all’attenzione dell’Autorità Giudiziaria;
- ✓ **obbligo di non erosione del Patrimonio viene mantenuto** perché finalizzato a garantire la copertura di eventuali perdite future ed in caso di erosione del Patrimonio Netto si incorrerebbe nella dissoluzione dell’ente;
- ✓ conclusione del processo di conciliazione avviato dalle parti: permane l’indicazione a gestire e risolvere le controversie delle partite contabili ancora in sospeso;

Si è tuttora in attesa della fissazione dell’udienza di merito.

Altre informazioni:

- **Approvazione modifiche statutarie Fondazione MBBM**

Le modifiche allo statuto sono state deliberate dal Consiglio di Amministrazione della Fondazione in data 26 ottobre 2020 e trasmesse alla Prefettura di Monza.

Si è provveduto con la pubblicazione sul sito del nuovo statuto.

➤ ***Emergenza Covid 19***

A partire dalla fine di febbraio/inizio marzo 2020 l'ospedale di Monza è diventato uno degli ospedali sul territorio lombardo deputato alla gestione dei casi di Covid 19.

Per circa 2 mesi quasi la totalità dei posti letto dell'ospedale sono stati dedicati a questa tipologia di pazienti.

Fin dall'arrivo del primo paziente, la Direzione di ASST Monza ha istituito una Unità di Crisi dedicata alla gestione dell'emergenza; all'interno di tale Unità è sempre stato presente il prof. Andrea Biondi, Direttore Scientifico della Fondazione, oltre che Direttore della Clinica pediatrica.

I reparti di Fondazione MBBM, il laboratorio e il Centro di ricerca Tettamanti, hanno adottato tutte le procedure definite all'interno dell'Unità di Crisi, nel rispetto delle indicazioni ministeriali e regionali.

Nei mesi di ottobre e novembre abbiamo assistito ad un recrudescenza della Pandemia (seconda ondata) alla quale ha fatto seguito anche nei primi mesi del 2021 una presenza costante di pazienti covid positivi.

A partire dal mese di ottobre Fondazione MBBM ha istituito una propria Unità di Crisi, a cui partecipano i primari delle tre unità oltre che del Laboratorio Tettamanti nella figura del prof. Gianni Cazzaniga, la risk manager, la responsabile del SIOT e tutta la direzione generale di Fondazione MBBM.

All'interno di queste riunioni il prof. Biondi ha riportato tutte le indicazioni che venivano definite in unità di crisi dell'ospedale e si è stabilito di volta in volta l'applicazione delle procedure ai reparti di fondazione oltre che la comunicazione costante a tutto il personale.

➤ ***Piano vaccinale***

A partire dal mese di gennaio 2021 Fondazione ha aderito al piano vaccinale per il covid 19 seguendo le indicazioni di ASST Monza. Tra gennaio e febbraio si è proceduto con la vaccinazione a tutto il personale sanitario e al personale amministrativo presente in struttura; il tasso di adesione del personale ha superato la percentuale del 95%.

Monitoraggio svolto dall'organo di controllo - modalità di effettuazione ed esiti:

Il collegio sindacale partecipa a tutti i consigli di amministrazione della Fondazione Tettamanti, entrando nel merito delle questioni oggetto di discussione e fornendo eventuali suggerimenti/indicazioni sia tecniche che strategiche.

Svolge i controlli sulle regolari procedure amministrative e, in sede di definizione dei documenti di bilancio di esercizio, predispone la propria Relazione.