FONDAZIONE TETTAMANTI

Per lo studio e la cura delle leucemie ed emopatie infantili

Fondazione M. Tettamanti - M. De Marchi ONLUS
Eretta in Ente morale con D.P.R. 24/02/1987
Prefettura di Monza e Brianza n. 8/133/1

RELAZIONE DI GESTIONE SCIENTIFICA FONDAZIONE M. TETTAMANTI

FONDAZIONE M.TETTAMANTI M. DE MARCHI ONLUS

Sede legale in Monza, Via Gian Battista Pergolesi, 33

Codice fiscale n. 95587550153

Iscritta al Registro delle Persone giuridiche tenuto presso la Prefettura di Milano al nr. d'ordine 196/325/1 e attualmente iscritta al Registro delle Persone giuridiche tenuto presso la Prefettura di Monza e della Brianza al nr. d'ordine 8 pagina 133 della parte analitica volume I

Unità di Ricerca 'Genetica della leucemia' (Giovanni Cazzaniga)

A. Progetti di ricerca

1. Caratterizzazione e drugtargeting disottogruppi di leucemia acuta linfoblastica pediatrica ad alto rischio

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.

(Finanziamento: grant Ricerca Finalizzata Giovani Ricercatori)

Task1.1. Pazienti con LAL associata a Sindrome di Down (Project Leader: Chiara Palmi)

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.

E' stato completato con successo lo studio per 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 (*Palmi et al. Hemasphere 2023*)

E' in corso uno screening esteso ed automatizzato (High Throughput Screening, HTS) 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*) *(abstract a Congresso AIEOP 2022).*

E' in fase di revisione un primo lavoro incentrato sull'applicazione di High Throughput Screening per identificare composti potenzialmente efficaci per il trattamento di pazienti pediatrici con BCP-ALL con prognosi sfavorevole, come i pazienti con sindrome di Down (DS) o portatori di riarrangiamenti che coinvolgono i geni PAX5 o KMT2A/MLL. Lo studio sottolinea il vantaggio dell'applicazione di HTS per l ricollocamento di farmaci in sottogruppi BCP-ALL resistenti alle terapie convenzionali. Da un lato, forniamo evidenze per l'uso di Venetoclax come potente composto antileucemico nella sindrome di Down, nei pazienti con PAX5 riarrangiati e nei neonati con MLL riarrangiati. D'altra parte, è stata prestata particolare attenzione ad opportuni gruppi di controllo per evitare la selezione di farmaci seppur attivi ma associati ad elevata tossicità per la controparte normale.

(*in revision: Biochemical Pharmacology, Special Issue on Pediatric Tumors*)

E' in fase di sottomissione un secondo lavoro in cui abbiamo esplorato la *combinazione di più farmaci*quale metodologia per ampliare le opportunità terapeutiche in malattie per le quali i trattamenti attuali non sono completamente curativi. In particolare, ci siamo occupati della BCP-*ALL pediatrica con riarrangiamento del gene CRLF2*, un sottotipo caratterizzato da scarso esito e arricchito nei bambini con sindrome di Down, pazienti molto fragili con un'elevata suscettibilità alla tossicità correlata al trattamento. Abbiamo indagato la combinazione del farmaco givinostat (ITF2357), un inibitore dell'istone deacetilasiche ha dimostrato di agire efficacemente contro la BCP-ALL CRLF2-r e abbiamo testato le possibili sinergie con una libreria di 174 farmaci, approvati o in studi preclinici, attraverso HTS.

(*in preparazione paper per Biochemical Pharmacology, Special Issue on Pediatric Tumors*)

Task 1.2.Targeting specifico di aberrazioni nel contesto del profilo di espressione genica Ph-like(Project Leader: Grazia Fazio)

Il sottotipo LALPh-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-LALPh-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; iv) sperimentare la risposta a farmaci specifici.

1.2.1. Targetingdeiriarrangiamenti del gene PAX5

E' stato pubblicato il lavoro di caratterizzazione di 289 casi pediatrici di BCP-ALL arruolati consecutivamente in Italia nei protocolli AIEOP-BFM ALL2000/R2006 attraverso un ampio profilo molecolare, integrando l'espressione genica, l'analisi del numero di copie e l'identificazione dei geni di fusione mediante NGS. Abbiamo identificato 135 casi senza riarrangiamenti genetici ricorrenti. Tra questi, 59 pazienti (43,7%) avevano il profilo 'Ph-like', associato a prognosi infausta, indipendentemente da altre caratteristiche ad alto rischio. Di particolare interesse, il gene PAX5 è risultato alterato nel 54,4% dei casi Ph-like rispetto al 16,2% dei casi non Ph-like, con 7 pazienti portatori di fusioni PAX5 coinvolgenti nuovi geni partner. Abbiamo caratterizzato ulteriormente i casi PAX5t, che hanno unospecifico profilo di espressione genic, con iperattivazionedi LCK. Per esplorare il possibile trattamento farmacologico, abbiamo selezionato Dasatinib, Bosutinib e Foretinib, oltre a Nintedanib, farmaci già approvati dalla FDA e noti per essere ligandi LCK. Abbiamo dimostrato l'efficacia dell'inibitore LCK BIBF1120/Nintedanib, come agente singolo o in combinazione con la chemioterapia convenzionale, sia ex vivo che nel modello di xenotrapianto derivato dal paziente, mostrando un effetto sinergico con il desametasone. Questo studio identifica una potenziale terapia per i pazienti a cattiva prognosi con fusione di PAX5.

(Fazio et al. eBiomedicine, 2022) (Proposta di studio a 'Ponte di Legno'group)

Task1.3. Targeting deiriarrangiamenti di JAK2 (PostDoc Manuel Quadri, borsa triennale AIRC PostDoc)

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 tirosinchinasi 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.

In una coorte di pazienti pediatrici di LAL-B ad alto rischio, tramite NGS abbiamo identificato11 traslocazioni di JAK2 con diversi partner, tra i quali PAX5 unico ricorrente. Scopo generale del progetto è quello di valutare l'efficacia della combinazione del trattamento TKI con agenti chemioterapici standard,che potrebbe permettere di mantenere l'efficacia riducendo l'intensità e la relativa tossicità della chemioterapia. Abbiamo dimostrato l'efficacia in vitro di CHZ868, inibitore tirosin-chinasico di classe II, con attività sinergica con BIBF1120/Nintedanib, inibitore di LCK (attivata in fusioni di PAX5). CHZ868 è efficace anche in vivo; è un farmaco promettente per il trattamento delle fusioni di JAK2 nella LAL-B, che in combinazione potrebbe ridurre la tossicità della chemioterapia convenzionale.

Poiché il targeting in vivo di CHZ868 non ha mostrato l'eradicazione completa di leucemia, con basso effetto sul sistema nervoso centrale, abbiamo inoltre applicato HTS ex-vivo di una libreria di 174 farmaci approvati da FDA su cellule di 4 casi con fusioni JAK2. Abbiamo confermato che Ruxolitinib(farmaco già in uso) non è efficace su JAK2 mentre AT9283, Fedratinib e Gandotinibsono risultati inibitori efficaci, specifici e non tossici JAK2. Inoltre, altri farmaci, non appartenenti agli inibitori JAK, si sono dimostrati specifici e non tossici per la coorte JAK2r, qualiBirinapant (Smac mimetico), JQ1 (inibitore BRD4), Fludarabina (Chemioterapia).

Grazie al soggiorno presso il laboratorio di J.Sarno/K.Davis a stanford, si stanno completando gli esperimenti di analisi single cell con CytOFF e del profilo metabolico cellulare associato a riarrangiamento di JAK2.

(Quadri et al. Presentazione orale selezionata ad ASH 2022; Manoscritto in preparazione).

Task 1.3. Ruolo del gene MSI2 nella leucemia linfoblastica acuta infant con riarrangiamento del gene MLL(Project Leader: Michela Bardini, PostDoc Luigia Valsecchi)

L'identificazione di nuovi geni coinvolti nella LALinfant 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 mRNAtarget 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 sovraespressoin tumori, compresa la leucemia, dove è coinvolto nella proliferazione cellulare, differenziazione e mantenimento del pool di cellule staminali.

Scopo generale del progetto è studiare il ruolo di MSI2 in LALinfantMLLr, sottotipo di leucemia ancora gravato da una prognosi molto sfavorevole. Questo avverrà nel contesto del prossimo protocollo Interfant-21, insieme ad altri studi biologici proposti. In una linea cellulare umana di LLA MLL-AF4+ in cui il gene MSI2 è stato inattivato tramite CRISPR/CAS9 genome editing, abbiamo dimostrato che l'assenza di MSI2 determina: uno svantaggio proliferativo delle cellule in vitro, una ridotta capacità leucemogenica in vivo e una sensibilizzazione ai farmaci glucocorticoidi in vitro (Desametasone o Prednisolone). I pazienti LAL infantMLLr sono tipicamente resistenti ai glucocorticoidi, perciò il ruolo di MSI2 in questo contesto è di particolare rilievo dal punto di vista clinico, gettando le basi per l'utilizzo di nuovi farmaci inibitori di MSI2 (es. Ro 08-2750) in combinazione con glucocorticoidi come nuova strategia terapeutica per il trattamento dei pazienti infant.

In corso lo studio di un modello di RNA-interference (RNAi) in campioni di patient-derivedxenograft (PDX) utilizzando un sistema di vettori lentivirali contenenti uno short hairpin RNA (shRNA) anti-MSI2 che consente una più fedele rappresentazione della complessità in vivo. I risultati preliminari in linee cellulari sono promettenti, in quanto l'espressione di MSI2 è ridotta (sia mRNA che proteina; in un un saggio di competizione clonale a lungo termine in vitro le cellule senza MSI2 diminuiscono progressivamente di numero a favore delle cellule controllo; inoltre, l'aggiunta di Desametasone alla co-coltura favorisce una selezione più rapida delle cellule CNTRL. Questi dati dimostrano che MSI2 è fondamentale per sostenere la crescita delle cellule MLLr LLA in vitro e che il suo silenziamento rende le cellule più sensibili all'effetto citotossico dei Glucocorticoidi (GCs). Sono in corso esperimenti di competizione clonale in vivo per confermare il ruolo cruciale di MSI2 nel sostenere la capacità leucemogenica della MLLrinfant LLA in vivo e il suo coinvolgimento nella resistenza ai farmaci.

(manoscritto in sottomissione per pubblicazione)

(*finanziamento grantFight Kids Cancer 2023; partecipazione a network internazionale per applicare a grantGrand Challenge Cancer UK*)

2. Caratterizzazione della fase pre-leucemicadella LAL del bambino (Project Leader Chiara Palmi)

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 (PostDocMaylaBertagna, borsa triennale AIRC PostDoc)

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 ainfezioni comuni sia il principale attore nella trasformazione maligna E/R+, che porta all'acquisizione di mutazioni secondarie. Tuttavia, gli eventi che precedono la leucemia conclamata e che caratterizzano la fase latente pre-leucemica, non sono mai stati studiati.

In collaborazione con la *Prof.ssa Laura Russo (Dipartimento di Chimica Bioorganica, Unimib*) stiamo sviluppando un modello 3D (mediante 3D bioprinting) 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.

Abbiamo acquisito un modello murino transgenico Sca1-ETV6-RUNX1 (*collaborazione con Isidro Sanchez Garcia, Salamanca, ES*), in cui insorge leucemia solo in seguito all'esposizione a patogeni comuni, pur con scarsa penetranza, simile alla condizione umana. Ci stiamo concentrando sullo studio della comunicazione tra cellule staminali e progenitrici ematopoietiche (HSPC) con il microambiente midollare in diverse condizioni di infezione. 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(PhDStudent Denise Acunzo, borsa Lions Sondrio)

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*fuzzylogic*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.

(Grant AIRC-IG Giovanni Cazzaniga 2019-23, in corso revisione di nuovo grant AIRC-IG 2024-28)

3. Predisposizione genetica a LAL pediatrica *(Project LeaderG.Cazzaniga; collaborazione Laura Bettini, Pediatra/PostDc)*

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.

Abbiamo stimolato l'introduzione di uno specifico questionario per tutti i bambini italiani con LAL arruolati al protocollo AIEOP-BFM ALL2017. Da queste risulta che 112 pazienti, il 12% dei pazienti arruolati al protocollo, presenta almeno un criterio clinico meritevole di approfondimento nel sospetto di una condizione predisponente i tumori. In particolare, 34/112 (30%) presenta anamnesi familiare positiva per ricorrenza di tumori giovanili: 15/34 riportano un familiare di I°, 13/34 un familiare di II°e 6/34 familiari di I e II°. In 80/112 (71%) si rileva almeno una comorbidità o una diagnosi genetica nota. A tutti i pazienti è stata proposta una consulenza genetica, accettata in 91/112 (81%). In accordo con i centri AIEOP e i genetisti di riferimento, ci siamo resi disponibili all'esecuzione di approfondimenti genetici (pannello NGS target, Whole ExomeSequencing, Whole Transcriptomeanalysis). Vari studi familiari sono in corso.

B.Board panel multidisciplinare di esperti.

Abbiamo costituito un panel di esperti (Genetista di laboratorio, Genetista clinico, Ematologi Pediatri, Tecnici di laboratorio) che discute le diverse richieste di analisi di casi con sospetto di alterazione genetica/predisposizione, decide 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, le immunodeficienzee rare malattie ematologiche (vedi progetto 4).

C.*Analisi di varianti genetiche in una coorte prospettica di pazienti LAL (PhDStudent Stefano Rebellato).*

Abbiamo analizzato 200 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 corsoil sequenziamento WES del DNA di remissione di malattia di 150 casi pediatrici che hanno sviluppato LAL (*collaborazione con Prof.M.Capasso, Napoli*), per identificare varianti germline associate all'insorgenza della malattia.

D. Analisi delle varianti di TP53 in LALipodiploide pediatrica.

La LALipodiploide è frequentemente associata a varianti di TP53, la maggior parte delle quali sono germline, suggerendo che la LALipodiploidepossa essere una manifestazione della sindrome di Li-Fraumeni (LFS).Abbiamo eseguito l'analisi NGSdi un pannello mirato di 40 geni, tra cui TP53, in una serie retrospettiva di pazienti italiani LALipodiploidi 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.
Sono in corso uno studio sui pazienti trapiantati (*collaborazione EBMT pediatric*), per identificare l'insorgenza di secondi tumori e capire l'incidenza dei diversi regimi di condizionamento, uno studio su pazienti trattati con diversi regimi chemioterapici (*coordinato da F.Ceppi, Losanna, CH*) e lo studio *prospettico* dei casi AIEOP LAL con ipodiploidia per successiva consulenza famigliare.

E. Mutazioni nei geni delle coesine e ruolo nella predisposizione genetica alla LAL pediatrica(PhDStudent Stefano Rebellato)

E' stato completato lo studio funzionale di due varianti dei geni delle coesine in pazienti LAL/MDS, in cui per la prima volta descriviamo un ruolo del gene STAG1 nella leucemogenesi e nell'aumentato rischio di insorgenza di disordini emato-oncologici (Saitta et al. Blood Cancer J. 2022;12(6):88) e collaborato allo studio del gene RAD21 (Schedel A, et al. Int J Mol Sci. 2022;23(9):5174). Lo studio procede con ulteriori caratterizzazioni genetiche e funzionali, attraverso metodologia CRISPR/CAS9.

Recentemente, abbiamo identificato fusioni somatiche di geni delle coesine (RNAseq alla diagnosi di BCP-ALL) e stiamo organizzando la raccolta internazionali di casi per caratterizzazione e pubblicazione)

4. Analisi di alterazioni genetiche in pazienti pediatrici con immunodeficienze

Continua la collaborazione con Dr. Francesco Saettini, della Clinica Pediatrica per la caratterizzazione di pazienti con immunodeficienza con sospetto di base genetica.

Nell'ultimo anno abbiamo identificato ed esplorato il diverso significato di variant identiche di EP300 in Rubinstein-Taybisyndrome con diverso fenotipo clinico ed immunologico

(Saettini F, et al. Am J MedGenet A. 2022;188:2129-2134).

Abbiamo inoltre descritto due pazienti con la stessa mutazione germinale di CBL e caratteristiche di sovrapposizione clinica e immuno-ematologica con sindrome linfoproliferativa autoimmune (ALPS) ed espansione delle cellule B con sindrome NF-κB e anergia delle cellule T (BENTA). I pazienti descritti hanno mostrato un fenotipo peculiare delle cellule B a causa dell'aumento delle cellule CD34+ immature/transizionali. Questa caratteristica differenzia la sindrome CBL dalla BENTA, indicando una proliferazione anormale dei precursori precoci delle cellule B

(Saettini et al. Front Pediatr. 2022)

L'Unità di Genetica della Leucemia, diretta dal Dr.Cazzaniga è composta da 3 Post Doc (M.Bardini, G.Fazio, C.Palmi), 5PhDstudent (L.Bettini, M.Bertagna, M.Quadri, L.Valsecchi, D.Acunzo), 1 PhDstudent Marie Curie Program (A.Oikonomou), 1 assegnista di ricerca nel 2022, Pediatra, Ematologa (M.D'Angiò), 1 Pediatra (F. Guerra, 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).

B. Progetti di ricerca traslazionale clinica a sostegno dei protocolli dell'Associazione Italiana Ematologia ed Oncologia Pediatrica (Project Leader Giovanni 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 LALPh+ (EsPhALL). Complessivamente in termini di attività, presso le unità di Biologia Molecola re e di Citogenetica del Centro Ricerca Tettamanti di Monza vengono riferiti il materiale per le analisi ed i dati dei 400 bambini ed adolescenti affetti da leucemia acuta linfoblastica in Italia e oltre il 10% direttamente per le cure.

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

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

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

L'utilizzo di tecnologie genomiche di avanguardia (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. 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).

Pubblicazioni scientifiche Unità Cazzaniga 2022-2023

1. Palmi C, Bresolin S, Junk S, Fazio G, Silvestri D, Zaliova M, Oikonomou A, Scharov K, Stanulla M, Moericke A, Zimmermann M, Schrappe M, Buldini B, Bhatia S, Borkhardt A, Saitta C, Galbiati M, Bardini M, Lo Nigro L, Conter V, Valsecchi MG, Biondi A, Te Kronnie G, Cario G, **Cazzaniga** G. Definition and Prognostic Value of Ph-like and IKZF1plus Status in Children With Down Syndrome and B-cell Precursor Acute LymphoblasticLeukemia. Hemasphere. 2023 May 26;7(6):e892. doi: 10.1097/HS9.0000000000000892. eCollection 2023 Jun. PMID: 37304931
2. Külp M, Larghero P, Alten J, Cario G, Eckert C, Caye-Eude A, Cavé H, Schmachtel T, Bardini M, **Cazzaniga** G, De Lorenzo P, Valsecchi MG, Bonig H, Meyer C, Rieger MA, Marschalek R. The EGR3 regulome of infant KMT2A-r acute lymphoblastic leukemia identifies differential expression of B-lineage genes predictive for outcome. Leukemia. 2023 Jun;37(6):1216-1233. doi: 10.1038/s41375-023-01895-z. Epub 2023 Apr 26. PMID: 37100882 Free PMC article.
3. Meyer C, Larghero P, Almeida Lopes B, Burmeister T, Gröger D, Sutton R, Venn NC, **Cazzaniga** G, Corral Abascal L, Tsaur G, Fechina L, Emerenciano M, Pombo-de-Oliveira MS, Lund-Aho T, Lundán T, Montonen M, Juvonen V, Zuna J, Trka J, Ballerini P, Lapillonne H, Van der Velden VHJ, Sonneveld E, Delabesse E, de Matos RRC, Silva MLM, Bomken S, Katsibardi K, Keernik M, Grardel N, Mason J, Price R, Kim J, Eckert C, Lo Nigro L, Bueno C, Menendez P, ZurStadt U, Gameiro P, Sedék L, Szczepański T, Bidet A, Marcu V, Shichrur K, Izraeli S, Madsen HO, Schäfer BW, Kubetzko S, Kim R, Clappier E, Trautmann H, Brüggemann M, Archer P, Hancock J, Alten J, Möricke A, Stanulla M, Lentes J, Bergmann AK, Strehl S, Köhrer S, Nebral K, Dworzak MN, Haas OA, Arfeuille C, Caye-Eude A, Cavé H, Marschalek R. The KMT2A recombinome of acute leukemias in 2023. Leukemia. 2023 May;37(5):988-1005. doi: 10.1038/s41375-023-01877-1. Epub 2023 Apr 5. PMID: 37019990
4. Ohki K, Butler ER, Kiyokawa N, Hirabayashi S, Bergmann AK, Möricke A, Boer JM, CavéH, **Cazzaniga** G, Yeoh AEJ, Sanada M, Imamura T, Inaba H, Mullighan CG, Loh ML, Norén-Nyström U, Shih LY, Zaliova M, Pui CH, Haas OA, Harrison CJ, Moorman AV, Manabe A. Clinical characteristics and outcomes of B-cell precursor ALL with MEF2D rearrangements: a retrospective study by the Ponte di Legno Childhood ALL Working Group. Leukemia. 2023 Jan;37(1):212-216. doi: 10.1038/s41375-022-01737-4. Epub 2022 Oct 29. PMID: 36309560
5. Soscia R, Della Starza I, De Novi LA, Ilari C, Ansuinelli M, Cavalli M, Bellomarino V, Cafforio L, Di Trani M, **Cazzaniga** G, Fazio G, Santoro A, Salemi D, Spinelli O, Tosi M, Terragna C, Robustelli V, Bellissimo T, Colafigli G, Breccia M, Chiaretti S, Di Rocco A, Martelli M, Guarini A, Del Giudice I, Foà R. Circulatingcell-free DNA for target quantification in hematologicmalignancies: Validation of a protocol to overcomepre-analyticalbiases. HematolOncol. 2023 Feb;41(1):50-60. doi: 10.1002/hon.3087. Epub 2022 Oct 19. PMID: 36251440
6. Fazio G, Bresolin S, Silvestri D, Quadri M, Saitta C, Vendramini E, Buldini B, Palmi C, Bardini M, Grioni A, Rigamonti S, Galbiati M, Mecca S, Savino AM, Peloso A, Tu JW, Bhatia S, Borkhardt A, Micalizzi C, Lo Nigro L, Locatelli F, Conter V, Rizzari C, Valsecchi MG, TeKronnie G, BiondiA, **Cazzaniga** G. PAX5 fusion genes are frequent in poor risk childhood acute lymphoblastic leukaemia and can be targeted with BIBF1120. EBioMedicine. 2022 Sep;83:104224. doi: 10.1016/j.ebiom.2022.104224. Epub 2022 Aug 16. PMID: 35985167
7. Saettini F, Coliva TA, Vendemini F, Galbiati M, Bugarin C, Masetti R, Moratto D, Chiarini M, Guerra F, Iascone M, Badolato R, **Cazzaniga** G, Niemeyer C, Flotho C, Biondi A. Abnormal B-Cell Maturation and IncreasedTransitional B Cells in CBL Syndrome. Front Pediatr. 2022 Jul 28;10:935951. doi: 10.3389/fped.2022.935951. eCollection 2022. PMID: 35967575
8. Zuna J, Hovorkova L, Krotka J, Koehrmann A, Bardini M, Winkowska L, Fronkova E, Alten J, Koehler R, Eckert C, Brizzolara L, Trkova M, Stuchly J, Zimmermann M, De Lorenzo P, Valsecchi MG, Conter

V, Stary J, Schrappe M, Biondi A, Trka J, ZaliovaM,*__Cazzaniga__ G,* Cario G.* (*co-last authors) Minimal residual disease in BCR::ABL1-positive acute lymphoblastic leukemia: different significance in typical ALL and in CML-like disease. Leukemia. 2022 Dec;36(12):2793-2801. doi: 10.1038/s41375-022-01668-0. Epub 2022 Aug 6. PMID: 35933523

9. Pezzotta A, Gentile I, Genovese D, Totaro MG, Battaglia C, Leung AY, Fumagalli M, Parma M, **Cazzaniga** G, Fazio G, Alcalay M, Marozzi A, Pistocchi A. HDAC6 inhibition decreases leukemic stem cell expansion driven by Hedgehog hyperactivation by restoring primary ciliogenesis. Pharmacol Res. 2022 Sep;183:106378. doi: 10.1016/j.phrs.2022.106378. Epub 2022 Jul 30. PMID: 35918044
10. Severgnini M, D'Angiò M, BungaroS, **Cazzaniga** G, Cifola I, Fazio G. Conjoined Genes as Common Events in Childhood Acute Lymphoblastic Leukemia. Cancers (Basel). 2022 Jul 20;14(14):3523. doi: 10.3390/cancers14143523. PMID: 35884588.
11. Külp M, Siemund AL, Larghero P, Dietz A, Alten J, Cario G, Eckert C, Caye-Eude A, Cavé H, BardiniM, **Cazzaniga** G, De Lorenzo P, Valsecchi MG, Diehl L, Bonig H, Meyer C, Marschalek R. The immune checkpoint ICOSLG is a relapse-predicting biomarker and therapeutic target in infant t(4;11) acute lymphoblastic leukemia. iScience. 2022 Jun 16;25(7):104613. doi: 10.1016/j.isci.2022.104613. eCollection 2022 Jul 15. PMID: 35800767
12. Ramos-Muntada M, Trincado JL, Blanco J, Bueno C, Rodríguez-Cortez VC, Bataller A, López-Millán B, Schwab C, Ortega M, Velasco P, Blanco ML, Nomdedeu J, Ramírez-Orellana M, Minguela A, Fuster JL, Cuatrecasas E, Camós M, Ballerini P, Escherich G, Boer J, DenBoer M, Hernández-Rivas JM, CalasanzMJ, **Cazzaniga** G, Harrison CJ, Menéndez P, Molina O. Clonal heterogeneity and rates of specific chromosome gains are risk predictors in childhood high-hyperdiploid B-cell acute lymphoblastic leukemia. MolOncol. 2022 Aug;16(16):2899-2919. doi: 10.1002/1878-0261.13276. Epub 2022 Jul 19.PMID: 35726693
13. Saitta C, Rebellato S, Bettini LR, Giudici G, Panini N, Erba E, Massa V, Auer F, Friedrich U, Hauer J, Biondi A, Fazio G, **Cazzaniga** G.Potential role of STAG1 mutations in genetic predisposition to childhood hematological malignancies.Blood Cancer J. 2022 Jun 2;12(6):88. doi: 10.1038/s41408-022-00683-9.PMID: 35654786
14. Lo Nigro L, Andriano N, Buldini B, Silvestri D, Villa T, Locatelli F, Parasole R, Barisone E, Testi AM, Biondi A, Valsecchi MG, Rizzari C, Conter V, Basso G, **Cazzaniga** G.FLT3-ITD in Children with Early T-cell Precursor (ETP) Acute Lymphoblastic Leukemia: Incidence and Potential Target for Monitoring Minimal Residual Disease (MRD).Cancers (Basel). 2022 May 17;14(10):2475. doi: 10.3390/cancers14102475.PMID: 35626079
15. Della Starza I, Eckert C, DrandiD, **Cazzaniga G**; EuroMRDConsortium. Minimal Residual Disease Analysis by Monitoring Immunoglobulin and T-Cell Receptor Gene Rearrangements by Quantitative PCR and Droplet Digital PCR. Methods Mol Biol. 2022;2453:79-89. doi: 10.1007/978-1-0716-2115-8_5. PMID: 35622321 (**book chapter**)
16. Schedel A, Friedrich UA, Morcos MNF, Wagener R, Mehtonen J, Watrin T, Saitta C, Brozou T, Michler P, Walter C, Försti A, Baksi A, Menzel M, Horak P, Paramasivam N, Fazio G, Autry RJ, Fröhling S, Suttorp M, Gertzen C, Gohlke H, Bhatia S, Wadt K, Schmiegelow K, Dugas M, Richter D, Glimm H, Heinäniemi M, JessbergerR, **Cazzaniga G**, Borkhardt A, Hauer J, Auer F. Recurrent Germline Variant in RAD21 Predisposes Children to Lymphoblastic Leukemia or Lymphoma. Int J Mol Sci. 2022 May 5;23(9):5174. doi: 10.3390/ijms23095174. PMID: 35563565
17. Bomken S, Enshaei A, Schwalbe EC, Mikulasova A, Dai Y, Zaka M, Fung KT, Bashton M, Lim H, Jones L, Karataraki N, Winterman E, Ashby C, Attarbaschi A, Bertrand Y, Bradtke J, Buldini B, Burke GA, **Cazzaniga G**, Gohring G, De Groot-Kruseman HA, Haferlach C, Nigro LL, Parihar M, Plesa A, Seaford E, Sonneveld E, Strehl S, Van der Velden VH, Rand V, Hunger SP, Harrison CJ, Bacon CM, Van Delft FW, Loh ML, Moppett J, Vormoor J, Walker BA, Moorman AV, Russell LJ. Molecular characterisation and clinical outcome of B-cell precursor acute lymphoblastic leukaemia with IG-MYC

rearrangement. Haematologica. 2022 Apr 28. doi: 10.3324/haematol.2021.280557. Online ahead of print. PMID: 35484682

18. Saettini F, Fazio G, Bonati MT, Moratto D, Massa V, Di Fede E, Castiglioni S, Marchetti D, Chiarini M, Sottini A, IasconeM, **Cazzaniga G**, Imberti L, Biondi A, Gervasini C, Badolato R. Identical EP300 variantleading to Rubinstein-Taybisyndrome with differentclinical and immunologicphenotype. Am J Med Genet A. 2022 Mar 9. doi: 10.1002/ajmg.a.62719. Online ahead of print.
19. Stutterheim J, de Lorenzo P, van der Sluin IM, Alten J, Ancliffe P, Attarbaschi A, Aversa L, Boer JM, Biondi A, Brethon B, Diaz P, **Cazzaniga** G, Escherich G, Ferster A, Kotecha RS, Lausen B, Leung AW, Locatelli F, Silverman L, Stary J, Szczepanski T, van der Velden VHJ, Vora A, Zuna J, Schrappe M, Valsecchi MG, Pieters R. Minimal residual disease and outcome characteristics in infant KMT2A-germline acute lymphoblastic leukaemia treated on the Interfant-06 protocol.Eur J Cancer. 2022;160:72-79
20. Antić Ž, Yu J, Bornhauser BC, Lelieveld SH, van der Ham CG, van Reijmersdal SV, Morgado L, Elitzur S, BourquinJP, **Cazzaniga** G, Eckert C, Camós M, Sutton R, Cavé H, Moorman AV, Sonneveld E, Geurts van Kessel A, van Leeuwen FN, Hoogerbrugge PM, Waanders E, Kuiper RP.Clonal dynamics in pediatric B-cell precursor acute lymphoblastic leukemia with very early relapse.Pediatr Blood Cancer. 2022;69:e29361
21. Buchmann S, Schrappe M, Baruchel A, Biondi A, Borowitz MJ, Campbell M, CarioG, **Cazzaniga G**, Escherich G, Harrison CJ, Heyman M, Hunger SP, Kiss C, Liu H-C, Locatelli F, Loh ML, Manabe A, Mann G, Pieters R, Pui C-H, Rives S, Schmiegelow K, Silverman LB, Stary J, Vora A, Brown PA. Remission, treatment failure, and relapse in pediatric ALL: An international consensus of the Ponte-di-Legno Consortium. Blood. 2022;139:1785-1793

RELAZIONE DI GESTIONE SCIENTIFICA FONDAZIONE M. TETTAMANTI 2022-2023
Direttore Scientifico: Prof. Andrea Biondi

A. Progetti di ricerca

Unità di Citometria e Terapia Molecolare (Dr. G. Gaipa)

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*

Il trasferimento adottivo di cellule CAR ha rivoluzionato il trattamento della leucemia linfoblastica acuta a cellule B (B-ALL), tuttavia dopo i primi risultati iniziali promettenti, sono emerse alcune criticità come l'insorgenza di recidive negative per CD19 (antigene bersaglio del CAR). Per superare i limiti del metodo virale nell'ingegneria delle cellule T, il nostro gruppo ha sviluppato cellule CIK (Cytokine Induced Killer) ingegnerizzate con CAR anti-CD19 attraverso una piattaforma basata su trasposon Sleeping-Beauty (SB) (CARCIK-CD19) (Magnani CF etal, JCI, 2020). Nel nostro centro è stata eseguito una fase I/II con CARCIK-CD19 con risultati incoraggianti. Al fine di prevenire e affrontare le recidive di leucemia post-CAR-T, abbiamo tratto vantaggio dalla tecnologia SB per sperimentare un approccio multi-targeting. In particolare abbiamo esploratoil targeting del CD22 specifico delle cellule B in combinazione con BAFF-R, che abbiamo precedentemente sviluppato e dimostrato di essere attivo nei confronti delle B-ALL. Lo scopo del progetto è stato dunque quello di sviluppare CAR anti-CD22 e anti-BAFFR da utilizzare in pazienti resistenti alle cellule CAR T anti-CD19, in una strategia multi-targeting.Abbiamo dunque generato cellule CARCIK partendo da cellule di donatori sani elettroporate con plasmidi SB codificanti per i CAR anti-CD22 e anti-BAFFR. L'espressione di CAR, l'immunofenotipomemoria delle cellule T e il profilo di esaurimento delle cellule CARCIK sono stati analizzati mediante citometria a flusso. L'attività di killing in vitro è stata valutata con cellule CAR T a bersaglio singolo e doppio. Per valutare la sicurezza, abbiamo valutato il numero di copie del vettore (VCN) alla fine delle differenziazioni tramite qPCR. L'efficacia in vivo è stata valutata sia nei modelli murini di leucemia acuta che di linfoma non-Hodgkin. Abbiamo preparato una molecola CAR diretta contro il CD22 (in un plasmide SB pT4 ottimizzato), insieme a 2 costrutti CAR anti-BAFFR (una terza generazione nel plasmide SB pT e una seconda generazione in un plasmide pT4). I prodotti delle cellule CAR T anti-CD22 e anti-BAFFR hanno dimostrato una cinetica di espansione simile dopo l'elettroporazione e l'attivazione in vitro a quella del CARCIK-CD19 originale. Per quanto riguarda l'immunofenotipo delle cellule CAR+, abbiamo osservato il tipico arricchimento nelle cellule CIK CD3+/CD56+ con netta prevalenzadella popolazione CD8+. Il profilo di memoriaha mostrato un arricchimento nella popolazione *central memory* ed *effector memory*sia nelle sottopopolazioni CD4 che CD8 CAR+. È stata osservata una robusta attività di killing sia per l'anti-CD22 che per l'anti-BAFFR CAR contro la linea cellulare leucemica NALM6. Il transposone VCN è risultato inferiore a 5 copie/cellule, che è considerata la soglia di rilascio di sicurezza per i prodotti clinici. Quindi, abbiamo testato CARCIK-CD22 *in vivo* utilizzando modelli murini di leucemia DAUDI. In particolare, CARCIK-CD22 ha eradicato la malattianel sangue periferico e negli organi al momento del sacrificio, e questo era associato alla persistenza delle cellule CAR nel sangue periferico fino al giorno +60 dalla infusione.In questo studio abbiamo dimostrato l'efficacia, la qualità e la sicurezza di CARCIK-CD22

trasfettato con SB derivato da donatore con una notevole attività antitumorale in modelli murini *in vitro* e *in vivo*. Sono in corso ulteriori esperimenti per valutare l'attività delle cellule T BAFFR-CAR *in vivo*. Nel complesso, abbiamo dimostrato la fattibilità dell'ingegnerizzazione non-virale CARCIK-CD22 e CARCIK-BAFFR da impiegare nel contesto di un approccio multi-targeting per prevenire e trattare le recidive B-ALL negative per CD19. Questo progetto fa parte del percorso di dottorato del Dr. Alex Moretti che si concluderà entro Novembre 2023. Il dottor Moretti è affiancato dalla dottoressa Beatrice Landoni.

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

Al fine di una migliore comprensione dei fattori biologici determinanti l'efficacia e la durata dell'azione dei linfociti CAR T in vivo abbiamo ipotizzato che vi possano essere differenze rilevanti nel trascrittoma delle cellule CAR T che persistono a lungo termine rispetto a quello dei linfociti CAR T che perdono la loro capacità di espansione e durata. A questo scopo utilizzeremo una tecnica di Single-cell RNA sequencing per indagare il microambiente midollare, la componente della malattia residua e le cellule CAR T. Gli esperimenti sono staticondotti in collaborazione con il Prof. M. Pagani (IFOM, Milano). Sonoutilizzati campioni ricavati da pazienti trattati con cellule CARCIK-CD19 o trattati con cellule CAR T commerciali. È stata costruita una libreria di espressione genica a singola cellula,scRNAseq [*Chromium Single Cell 5-library and V(D)J enrichment kit (10× Genomics*)]. I dati attualmente ottenuti hanno dimostrato la fattibilità della procedura di sorting delle popolazioni in termini di purezza e vitalità. Abbiamo analizzato piu' di 10 campioni raccolti da pazienti trattati con cellule CAR-T a diversi time points e con diversi gradi di risposta alla terapia sui quali abbiamoindagatoi parametri biologici sopra descritti. Risultati in sintesi:Abbiamo dimostrato che le cellule CAR T post-trattamento suscitano una risposta acuta che coinvolge il sistema della immunità innata e a cui segue un processo di risoluzione durante il primo mese dopo l'infusione. Per comprendere quali fossero i mediatori responsabili della regolazione dell'infiammazione mediata da cellule CAR T, abbiamo utilizzato un approccio a singola cellula nel midollo osseo (BM) dei pazienti i con B-ALL trattati con cellule CAR-T. Abbiamo osservato una netta modulazione nella composizione BM 1mese dopo l'infusione di cellule CAR-T, nonché un aumento significativo della frazione di cellule mieloidi e Natural Killer. Inoltre abbiamo osservato un arricchimento significativo del profilo di espressione genica associato alla risposta dell'interferone, al signalling di IL-6,l'ipossia. Inoltreabbiamo osservato che il signalling WNT/β-catenina era associata aespansione delle cellule soppressorie di derivazione mieloide (MDSC). In parallelo, il signalling di TGF-β ed i marcatori di esaurimento/senescenza cellulare sono stati osservati nelle cellule T CD8+ endogene ee nelle cellule CAR T infuse. Inoltre grazie a modelli di bioinformatica, abbiamo osservato che i fattori HIF1α, TLR2 e TGFβRII sono fondamentali nel dialogo tra le cellule CAR T e la nicchia immunitaria,che portano alla conseguenzadi una generale soppressione immunitaria. In conclusione, possiamo ipotizzare che le cellule CAR T mediante l'attivazione mieloide attivano *pathways* immunitarideregolazione che possono in ultima istanza smorzare l'espansione delle cellule CAR T e limitare gli effetti della terapia.Questi dati sono tutt'ora in corso di validazione su un numero significativo di campioni primari di B-LLA. Essi hanno costituito il copro del progetto di dottorato DIMET della dottoressa Marianna Ponzo (discusso in aprile 2023) e costituiranno, insieme alle validazioni i dati per una pubblicazione su una rivista scientifica entro la prima metà del 2024.

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

Nell'ambito della nostra collaborazione con il consorzio europeo EUROFLOW (*in collaborazione con il Prof. Alberto Orfao, Salamanca*) sono stati sviluppati pannelli di anticorpi specifici per la caratterizzazione

immunologica e funzionale di tutte le popolazioni cellulari misurabili durante il follow-up dei pazienti trattati con cellule CAR-T. In questo contesto abbiamo intrapreso uno studio di monitoraggio immunologico longitudinale del dei pazienti trattati con cellule CARCIK-CD19 prima e dopo la somministrazione. Abbiamo studiato 27 pazienti con LLA-B recidivante/refrattaria (r/r) dopo trapianto allogenico di midollo osseo. I campioni di sangue periferico o midollo osseo sono stati raccolti in diversi time-points dall'infusione e sono stati analizzati per quantificare la malattia minima residua (MRD), la quantità, la cinetica, la persistenza e l'immunofenotipo delle cellule CAR. Abbiamo voluto valutare l'impatto di diversi parametri immunologici sugli endpoint clinici (sopravvivenza, risposta alla terapia). Abbiamo inoltre studiato il ruolo del residuo tumorale prima dell'infusione. In questo studio abbiamo dimostrato che il carico tumorale dopo la linfodeplezione è associato alla sopravvivenza globale (OS) del paziente, alla remissione completa al giorno 28 dall'infusione e allo stato di sopravvivenza a 6 mesi dopo l'infusione. I livelli di MRD al giorno 28 sono significativamente correlati con la OS, dimostrando tale parametro ha un forte valore predittivo. I nostri dati dimostrano anche che la persistenza delle cellule CAR-T in momenti successivi rispetto al giorno 28 è un fattore predittivo rilevante per la durata della risposta alla terapia. Infine, l'immunofenotipodelle cellule CAR-T CD8+ misurato al giorno 10-14 o al giorno 28 dall'infusione è associato a un livello più basso di MRD indicando che il fenotipo citotossico è associato a una maggiore efficienza in vivo. Il monitoraggio immunologico dopo l'infusione di cellule CAR-T è rilevante per una migliore comprensione dei meccanismi alla base delle azioni delle cellule CAR-T e per migliorare l'uso clinico di tali prodotti medicinali di terapia avanzata. Questi dati sono ora aggiornati su una serie allargata di pazienti e con un follow-up piu' prolungato. Questo progetto è condotto dalla dottoressa Chiara Buracchi.

4.0Caratterizzazione *immunofenotipica della JMML per una migliore diagnosi*

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 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.Il lavoro scientifico è alla seconda revisione presso la rivista Haematologica. Questo progetto è stato condotto dalla dottoressa Cristina Bugarin.

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

Si tratta di progetti che si sviluppano attraverso la nostra collaborazione con il consorzio europeo Euroflow nell'ambito specifico delle LLA-B e delle LLA-T (ved. Pubblicazioni del periodo 2022-2023). Questo progetto è condotto dalla dottoressa Chiara Buracchi.

6.0*La sensibilità in vitro delle T-ALL agli steroidi è influenzata dall'Interleuchina-7 (IL-7) ed è efficacemente modulata dall'inibitore JAK/STAT.*

La leucemia linfoblastica acuta a cellule T (T-ALL) è una neoplasia ematologica aggressiva che deriva dalla trasformazione e dall'espansione clonale di precursori delle cellule T. Il trattamento clinico prevede una fase preliminare con Prednisone (PDN) ela risposta alla terapia steroidea rappresenta un fattore prognostico rilevante le cui basi molecolari e cellulari sono ancora poco conosciute.Questo progetto è focalizzato sui meccanismi di resistenza agli steroidi che coinvolgono le vie di segnale JAK/STAT e PI3K/AKT/mTor attivate da IL-7.Otto campioni primari di T-ALL alla diagnosi,provenienti da pazienti *PDN GoodResponder* (PGR) o PDN *PoorResponder (PPR),*sono stati trattati con IL-7, PDN,Ruxolitinib (RUXO) e NVP-BEZ 235 (BEZ), specifici per le vie JAK/STAT e PI3K/AKT/mTor.Il profilo proteomico e fosfoproteomicoa singola cellula è stato valutato mediante citometria a flusso, mentre la vitalità cellulare è stata valutata mediante saggio di tossicità *in vitro*.In presenza di IL-7 abbiamo osservato un aumento della vitalità delle cellule T-ALL in coltura, associato all'attivazione di marcatori di proliferazione come Ki67 e delle vie di JAK/STAT e PI3K /AkT/mTor, insieme a una generale diminuzione della sensibilità al PDN. In queste condizioni, la combinazione PDN + RUXO ha contribuito in modo significativo alla risposta al PDN rispetto alle condizioni con PDN da solo o con i singoli inibitori. Tale combinazione è risultata ancora più efficace della combinazione PDN+BEZ, indipendentemente dal fatto che i campioni provenissero da pazienti PPR o PGR. Inoltre, la presenza di IL-7, attivando direttamente la via JAK/STAT, ha permesso di aumentare la frazione di cellule proliferanti particolarmente sensibili all'azione combinata di PDN e dell'inibitore RUXO.I nostri dati, ulteriormente estesi, possono contribuire all'identificazione di nuovi approcci terapeutici per i pazienti affetti da T-ALLche ad oggi non rispondono adeguatamente alla terapiasteroidea convenzionale. Questo progetto è condotto dalla dottoressa Cristina Bugarin.

7.0*Analisi del chimerismo in pazienti sottoposti a trapianto allogenico di cellule staminali ematopoietiche mediante una nuova metodica citofluorimetrica basata su RNA*

Come noto, l'analisi del chimerismo totale, o su specifiche sottopopolazioni leucocitarie, ha un impatto significativo sulla prognosi dei pazienti sottoposti a trapianto di cellule staminali ematopoietiche (HSCT)ed è fondamentaleper individuare e trattare precocemente un rigetto o una recidiva di malattia. L'analisi del chimerismo mediante STR-PCR, metodica di riferimento, presenta limitazioni quali la sensibilità, le difficoltà tecniche del FACS-sorting e i costi elevati. In questo contesto abbiamo sperimentatouna nuova metodica per determinare il chimerismo sfruttando l'ibridazione di specifici trascritti di RNA che vengono successivamente rilevati mediante citofluorimetria. Per poter distinguere le cellule del donatore e del ricevente, abbiamo selezionato cometarget KDM5D, una lisina-demetilasicodificata dal cromosoma Y. Con questo approccio è stato possibile discriminare le cellule maschili da quellefemminilianalizzando il chimerismo in pazienti trapiantati con un *mismatch* di sesso donatore-ricevente.La metodica è stata validata inizialmente su campioni di soggetti sani.Successivamenteabbiamo analizzato campioni di sangue periferico da pazienti trapiantati (n=10) per patologie non oncologiche e oncologiche (n=6 drepanocitosi, n=2 beta-talassemia, n=1 mucopolisaccaridosi tipo I, n=2 leucemia linfoblastica acuta) con chimerismo misto (range 0-70%, mediana 15% chimerismo del ricevente). I risultati sono stati confrontati con i dati ottenuti mediante STR-PCRdimostrando una correlazione significativatra le due metodiche sia sul totale dei leucociti sia su specifiche popolazioni. Associando al chimerismo specifici pannelli di anticorpi monoclonali è stato anche possibile studiare l'immunofenotipo memoria dei linfociti T e dei linfociti B. I dati ottenuti

mediante citofluorimetria sono stati anche validati mediante *digital droplet PCR* che ha consentito di confermare i livelli di espressione di KDM5D.Inoltre, abbiamo effettuato analisi di malattia residua minima in un singolo caso ottenendo un risultato comparabile alla Q-PCR. In conclusione, i nostri risultati dimostrano che è possibile sfruttare l'ibridazione dell'RNA per eseguire l'analisi del chimerismo post-HSCT mediante citofluorimetria. Questo approccio fornisce risultati paragonabili alla STR-PCR, ma offre il vantaggiodi un'analisi popolazione-specifica delle cellule immunitarie, senza necessità di FACS-sorting e con costi ridotti. Il nostro approcciorappresenta un'innovazionenello studio del chimerismo post-HSCT e può fornire nuove rilevanti informazioni riguardo l'immunoricostituzione.

8.0*Studio dell'immunoricostituzione dopo trapianto allogenico di cellule staminali ematopoietiche per leucemia linfoblastica acuta*

L'immunoricostituzione ha un impatto prognostico fondamentale per i pazienti sottoposti a HSCT, in particolare per patologie oncologiche. Utilizzando metodiche citofluorimetriche altamente standardizzabili e sensibili, sviluppate all'interno del consorzio EuroFlow, di cui il nostro Centro è parte, abbiamo studiato l'immunoricostituzione in 22 pazienti sottoposti a HSCT per leucemia linfoblastica acuta (LLA) presso il nostro Centro. La piattaforma utilizzata consente di valutare nel dettaglio i subsets linfocitari, in particolare per quanto riguarda i linfociti T e B. Partendo dai dati ottenuti, stiamo attualmente caratterizzando una sottopopolazione di linfociti T CD4+ che ha mostrato una correlazione con lo sviluppo di *graft versus host disease* (GvHD) acuta. Tale popolazione, individuata come CD183+CD194+CD196-CCR10- è presente in misurasignificativamente maggiore nei pazienti trapiantati rispetto ai controlli sani, ed è attualmente non caratterizzata né dal punto di vista fenotipico né funzionale. In parallelo, in collaborazione con altri centri EuroFlow, stiamo validando un pannello anticorpale innovativo che consentirà di sviluppare uno studio multicentrico per l'immunoricostituzione post-HSCT nei pazienti pediatrici.

9.0*Valutazione della funzionalità timica dopo trapianto allogenico di cellule staminali ematopoietiche per leucemia linfoblastica acuta e dell'impatto dei farmaci utilizzati*

In parallelo allo studio dei linfociti T e B maturi, stiamo valutando la funzione del timo dopo trapianto nei pazienti con LLA. I pazienti con LLA ricevono un regime di condizionamento basato su irradiazione total body (TBI) e chemioterapia (Etoposide). Tale regime danneggia significativamente la funzionalità del timo. In parallelo, i pazienti che ricevono un trapianto da donatore allogenico non familiare (MUD) ricevono come profilassi della GvHD le timoglobuline, che oltre a danneggiare il timo hanno come bersaglio anche i progenitori linfoidi. Stiamo pertanto valutando nella nostra coorte di pazienti la ricostituzione dei *recent thymic emigrants* (RTE). Si tratta di una sottopopolazione di linfociti CD4 *naive* che emergono dal timo e hanno limitato potenziale proliferativo. Pertanto gli RTE costituiscono una misura diretta dell'attività del timo. Dai dati preliminari ottenuti nei nostri pazienti (n=32, 1-47 mesi post-HSCT), si può osservare come le ATG abbiano un impatto significativo sulla ricostituzione degli RTE nei primi mesi. Dati presenti in letteratura mettono gli RTE in relazione con lo sviluppo di GvHD. Attualmente stiamo valutando come gli RTE presenti nei primi mesi post-HSCT possano impattare sulla GvHD e stiamo cercando di valutare se la selezione timica avvenga o meno correttamente in seguito a TBI.

I progetti dal 7 a 9 sono condotti dalla dottoressa Silvia Nucera con il supporto del dottor Marco Sindoni.

*L'Unità diretta dal Dr.G. Gaipa è costituita dalla Dr.ssa Buracchi C.**,** Biologa, PhD – Assistente di Ricerca, Dr.ssa Bugarin C. Biologa, Assistente di Ricerca; Dr.ssa Giusi Melita G.,Biotecnologa, Assistente di Ricerca**,** Dr.ssa Ponzo M. Biologa, PhD ricercatrice post-doc**,** Dr. Morett A., Medico PhD student; Dr. Sindoni M., biotecnologo, borsista Assistente di Ricerca; Dottoressa Landoni B. biotecnologa, borsista Assistente di Ricerca. Inoltre è ancora attiva una collaborazione con la Dr.ssa Chiara Francesca Magnani, assistant professor presso il Children Hospital di Zurigo (CH).*

Pubblicazioni scientifiche Unità Gaipa da gennaio 2022 a giugno 2023

1. Sarno J, Domizi P, Liu Y, Merchant M, Pedersen CB, Jedoui D, Jager A, Nolan GP, Gaipa G, Bendall SC, Bava FA, Davis KL. Dasatinib overcomes glucocorticoid resistance in B-cell acute lymphoblastic leukemia. Nat Commun. 2023 May 22;14(1):2935. doi: 10.1038/s41467-023-38456-y.
2. Campbell M, Kiss C, Zimmermann M, Riccheri C, Kowalczyk J, Felice MS, Kuzmanovic M, Kovacs G, Kosmidis H, Gonzalez A, Bilic E, Castillo L, Kolenova A, Jazbec J, Popa A, Konstantinov D, Kappelmayer J, Szczepanski T, Dworzak M, Buldini B, Gaipa G, Marinov N, Rossi J, Nagy A, Gaspar I, Stary J, Schrappe M. Childhood Acute Lymphoblastic Leukemia: Results of the Randomized Acute Lymphoblastic Leukemia Intercontinental-Berlin-Frankfurt-Münster 2009 Trial. J Clin Oncol. 2023 May 4: JCO2201760. doi: 10.1200/JCO.22.01760. Online ahead of print.PMID: 37141547.
3. Guarini A, Radice G, Peragine N, Buracchi C, De Propris MS, Di Rocco A, Di Rocco A, Chiaretti S, Moretti A, Napolitano S, Martelli M, Balduzzi A, Gaipa G, Biondi A, Foà R. Long-Term Host Immune Modulation Following Tisagenlecleucel Administration in Patients with Diffuse Large B-Cell Lymphoma and B-Lineage Acute Lymphoblastic Leukemia. Cancers (Basel). 2023 Apr 22;15(9):2411. doi: 10.3390/cancers15092411.
4. Genchi A, Brambilla E, Sangalli F, Radaelli M, Bacigaluppi M, Furlan R, Andolfo A, Drago D, Magagnotti C, Scotti GM, Greco R, Vezzulli P, Ottoboni L, Bonopane M, Capilupo D, Ruffini F, Belotti D, Cabiati B, Cesana S, Matera G, Leocani L, Martinelli V, Moiola L, Vago L, Panina-Bordignon P, Falini A, Ciceri F, Uglietti A, Sormani MP, Comi G, Battaglia MA, Rocca MA, Storelli L, Pagani E, Gaipa G, Martino G. Neural stem cell transplantation in patients with progressive multiple sclerosis: an open-label, phase 1 study. Nat Med. 2023 Jan;29(1):75-85. doi: 10.1038/s41591-022-02097-3. Epub 2023 Jan 9. PMID: 36624312
5. Bacci L, Indio V, Rambaldelli G, Bugarin C, Magliocchetti F, Del Rio A, Pollutri D, Melchionda F, Pession A, Lanciotti M, Dufour C, Gaipa G, Montanaro L, Penzo M.
   Mutational analysis of ribosomal proteins in a cohort of pediatric patients with T-cell acute lymphoblastic leukemia reveals Q123R, a novel mutation in RPL10.
   Front Genet. 2022 Nov 22; 13:1058468. doi: 10.3389/fgene.2022.1058468. eCollection 2022.PMID: 36482893Free PMC article.
6. Oliveira E, Costa ES, Ciudad J, Gaipa G, Sedek Ł, Barrena S, Szczepanski T, Buracchi C, Silvestri D, Siqueira PFR, Mello FV, Torres RC, Oliveira LMR, Fay-Neves IVC, Sonneveld E, van der Velden VHJ, Mejstrikova E, Ribera JM, Conter V, Schrappe M, van Dongen JJM, Land MGP, Orfao A; EuroFlow Consortium. Bone Marrow Stromal Cell Regeneration Profile in Treated B-Cell Precursor Acute Lymphoblastic Leukemia Patients: Association with MRD Status and Patient Outcome. Cancers (Basel). 2022 Jun 23;14(13):3088. doi: 10.3390/cancers14133088. PMID: 35804860.

7. Kuzilková D, Bugarin C, Rejlova K, Schulz AR, Mei HE, Paganin M, Biffi A, Biondi A, Kalina T, Gaipa G. Either IL-7 activation of JAK-STAT or BEZ inhibition of PI3K-AKT-mTOR pathways dominates the single-cell phosphosignature of ex vivo treated pediatric T-cell acute lymphoblastic leukemia cells. Haematologica. 2022 Jun 1;107(6):1293-1310. doi: 10.3324/haematol.2021.278796. PMID: 34670357 Free PMC article.
8. Capelli C, Frigerio S, Lisini D, Nava S, Gaipa G, Belotti D, Cabiati B, Budelli S, Lazzari L, Bagnarino J, Tanzi M, Comoli P, Perico N, Introna M, Golay J.
   A comprehensive report of long-term stability data for a range ATMPs: A need to develop guidelines for safe and harmonized stability studies. Cytotherapy. 2022 May;24(5):544-556. doi: 10.1016/j.jcyt.2021.12.004. Epub 2022 Feb 15. PMID: 35177338 Free article.
9. Verbeek MWC, Buracchi C, Laqua A, Nierkens S, Sedek L, Flores-Montero J, Hofmans M, Sobral de Costa E, Nováková M, Mejstrikova E, Barrena S, Kohlscheen S, Szczepanowski M, Kulis J, Oliveira E, Jugooa R, de Jong AX, Szczepanski T, Philippé J, van Dongen JJM, Orfao A, Brüggemann M, Gaipa G, van der Velden VHJ. Flow cytometric minimal residual disease assessment in B-cell precursor acute lymphoblastic leukaemia patients treated with CD19-targeted therapies - a EuroFlow study. Br J Haematol. 2022 Apr;197(1):76-81. doi: 10.1111/bjh.17992. Epub 2021 Dec 8. PMID: 34881427 Free PMC article.

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 terapia avanzate (cellulari e geniche) da parte della FT data molto prima. Tappa essenziale di tale sviluppo è stata la realizzazione del Laboratorio di Terapia Cellulare e Genica (autorizzato dall'AIFA nel 2007) realizzato dal Comitato ML Verga e Comitato S.Verri, e il cui personale è totalmente a carico della FT. Il primo successo di terapie avanzate cellulari è dovuto all'attività di ricerca della Dr.sa D'Amico con lo sviluppo di un protocollo di terapia cellulare per il trattamento della GVHD resistente ad ogni trattamento in collaborazione con i Colleghi dell'Ematologia dell'Ospedale Papa Giovanni 23 di Bergamo (Unità diretta dal Prof. A. Rambaldi). La storia dei CART al Centro Tettamanti inizia il ritorno del Dr.E.Biagi dopo un periodo intenso e proficuo presso il Baylor College di Houston, USA. Nel 2006 il Dr.E.Biagi insieme ad altri ricercatori europei, di ritorno dagli Stati Uniti, scrive un progetto accolto e finanziato dalla CE e con un titolo davvero significativo per la storia futura: "*Childhope*". Purtroppo tale progetto, pioniere in quegli anni, non vide alcuna applicazione, almeno in Italia per le problematiche di complessità autorizzativa del protocollo.

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

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 ResearchSponsored 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 CoImmune (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. 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 CoImmune.

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.sseRotiroti 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'InvestigationalMedical Product Dossier (IMPD) che deve accompagnare la proposta di studio clinico all'AIFA per procedere alla sua sperimentazione.

9.2 Sviluppo di un costrutto 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 Dr Tettamantiha sviluppato 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. I dati prodotti sono stati descrittiin un lavoro che è stato pubblicato sulla rivista scientifica Blood Advances.

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 check-pointimmunitario, 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, abbiamo disegnato cellule CAR "bi-specifiche", accoppiando il CD33.CAR a un CCR che riconosce TIM-3. La specifica attività antileucemica di questo CAR è stata verificatain vitro ed attualmente si sta procedendo alla messa a punto di un modello in vivo che permetta la valutazione della sua efficacia in vivo.

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 diretto contro la molecola CD33, un antigene espresso dalla maggior parte dei blasti LMA, sia dal recettore CXCR4. In sostanza, abbiamo dimostratoche 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. Abbiamo dimostrato che la sovraespressione nelle cellule CD33.CAR-CIK del recettore CXCR4 favorisce un migliore controllo della leucemia e una sopravvivenza prolungata del modello murino. La descrizione di questo studio, che permette di concludere che armare le cellule CAR-T con un recettore chemochinico può rappresentare una strategia promettente per l'aumento del loro potenziale terapeutico, è stata pubblicata sulla rivista Blood.

Questo progetto è svolto in collaborazione con il Prof. Dotti G. (University of North Carolina, USA)

9.4 Sfruttamento dell'asse CXCL8-CXCR1/2 per direzionare in maniera ancora più specifica le cellule CD33.CAR-CIK nella nicchia del midollo osseo AML

Alla luce dei risultati descritti al punto 9.3, abbiamo deciso di implementare ulteriormentele strategie al fine di massimizzare la capacità delle cellule CAR-T di raggiungere la nicchia della leucemia e persistere nel microambiente midollare ostile, al fine di mediare risposte clinicamente rilevanti.Vogliamo affrontare tale problema valutando la possibilità di migliorare il traffico e la ritenzione delle cellule CD33.CAR-T nella nicchia leucemica attraverso l'espressione forzata dei recettori per chemochine CXCR1 e CXCR2, il cui ligando CXCL8 è fortemente espressoall'interno del microambiente tumorale ed è associato a molteplici ruoli pro-tumorigenici, compreso il reclutamento di cellule soppressorie di derivazione mieloide, la progressione della malattia e la chemioresistenza.

9.5 *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 AdhesionMolecule) 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. Proprio l'interazione tra LSC e stroma sembra contribuire alla limitata efficacia osservata nelle prime applicazioni cliniche dell'immunoterapia con cellule CAR-T. Quindi, lo sviluppo di next generation CAR-T che bersaglino contemporaneamente le LSCs e la nicchia stromale potrebbe rappresentare una strategia terapeutica innovativa e di maggior efficacia. Come prova di concetto, abbiamo disegnato un nuovo prototipo di Tandem CAR con una specificità diretta contro le cellule leucemiche e

l'altra contro le MSC, prendendo di mira simultaneamente le cellule leucemiche e stromali. I risultati ottenuti confermano la possibilità di produrre un Tandem CAR quale modello di next generation CARs che possa potenziare l'attività antileucemica delle cellule CAR-T colpendo al contempo componenti stromali immunosoppressive della nicchia midollare.
Questo studio è stato recentemente pubblicato sulla rivista Frontiers in Immunology.

9.6 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.ssa 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 profilodi differenziamento 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 Notchsignalling 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-specificAlkalinePhosphatase (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 Notchsignalling venga 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. Abbiamo, infine, indagato 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. I dati ottenuti indicano che i blasti LMA possono indurre nelle cellule stromali un'alterazione nelle prime fasi dell'osteogenesi, parzialmente mediata dall'attivazione del Notchsignalling, in grado di favorire la generazione di una nicchia pro-leucemica. Questi risultati sono stati descritti in un manoscritto che verrà sottomesso nei prossimi mesi (abstract già accettato) alla rivista Frontiers in Immunology.

11. Individuazione di nuovi assi chemochinici preferenzialmente espressi nella leucemia mieloide acuta (Dr.ssa M.Serafini)

Il microambiente del midollo osseo svolge un ruolo fondamentale nello sviluppo, nella progressione e nella ricaduta della LMA. È ormai noto che l'interazione leucemia/microambiente contribuisce alla resistenza alla chemioterapia e alla ricaduta della malattia. Le cellule stromali mesenchimali presenti nel microambiente sono caratterizzate dalla capacità di modulare le loro proprietà immunofenotipiche, secretorie, metaboliche e migratorie a seconda delle condizioni del microambiente. Questo studio mira ad eseguire una caratterizzazione approfondita del microambiente patologico al fine di identificarne nuovi assi chemochinici caratteristici. In particolare, l'espressione di antigeni/fattori solubili può essere sfruttata per dirigere preferenzialmente la terapia con cellule CAR-T al midollo osseo e aumentare la loro persistenza locale, migliorando la potenza di queste cellule nell'eliminazione delle cellule staminali leucemiche. Ad esempio, il traffico mediato da chemochine può essere sfruttato per migliorare l'attività dei linfociti CAR-T. Le chemochine e i loro recettori sono, infatti, cruciali per la migrazione e l'homing dei linfociti e svolgono un ruolo critico nell'interazione tra blasto e cellule stromali all'interno della nicchia.

Questo progetto è svolto in collaborazione con la Prof.ssa Quintarelli C (*OPBG, Roma).*

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

La mucopolissacaridosi di tipo I (MPS-I) è una malattia genetica rara causata dalla carenza dell'enzima alfa-L-iduronidasi, che porta ad un accumulo progressivo di glicosamminoglicani (GAGs) in tutti gli organi e tessuti. I pazienti affetti presentano manifestazioni cliniche multisistemiche di gravità variabile, tra cui un fenotipo scheletrico complesso denominato disostosi multipla, che è una delle espressioni cliniche più invalidanti e meno curabili della malattia.

I meccanismi patogenetici cellulari e molecolari alla base della disostosi multipla sono ancora poco conosciuti.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 possa essere alterato anche nei pazienti, abbiamo isolato dal loro midollo osseo cellule stromali mesenchimali. Queste cellule sono state 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 e biochimiche abbiamo potuto elucidare quali anomalie vi siano a livello dei processi di condrogenesi e ossificazione. L'analisi molecolare, effettuata mediante tecniche di trascrittomica (RNA seq), ci ha permesso di ampliare le conoscenze dei diversi meccanismi coinvolti nella disostosi multipla caratteristica di questi pazienti edi identificare nuovi bersagli terapeutici per il trattamento dei pazienti MPS-IH.Inoltre, l'alterazione di pathway coinvolti nell'organizzazione della matrice cellulare e metabolismo dei GAG, conferma che il nostro modello riproduce fedelmente alcuni aspetti già noti della patologia. In generale, questo studio dimostra che il

sistema basato su organoidi potrebbe essere uno strumento molto valido per comprendere imeccanismi che sono alla base del fenotipo scheletrico della MPS-I e per sviluppare nuoviapprocci terapeutici. Questi risultati sono stati descritti in un manoscritto in via di sottomissione.

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, un significativo miglioramento dei difetti muscoloscheletrici e neurocognitivi rimane ancora una sfida in quanto impatta la qualità della vita dei pazienti. 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 animale della malattia, abbiamo dimostrato come l'utilizzo di un approccio di terapia genica, se effettuato in un'epoca estremamente precoce, possa prevenirele manifestazioni cliniche negli organi solitamente refrattari al trattamento corrente. Abbiamo potuto apprezzare un ridotto accumulo viscerale di GAGs. A livello scheletrico il trattamento ha determinato un significativo miglioramento a livello radiografico e istologico con evidenza di normalizzazione dei parametri morfometrici sia metafisari che corticali. Inoltre, l'efficacia terapeutica a livello del sistema nervoso centrale è stata dimostrata dalla 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, Universita' La Sapienza, Roma*), con il Professor Tomatsu S(*Hospital for Children di Willmington, DE, USA*) e con il Prof. Aiuti A (*Tiget, Ospedale San Raffaele, Milano*).

L' attività di ricerca nell'ambito delle malattie lisosomiali è risultata strategica per il riconoscimento delle attività della Clinica Pediatrica in "MetabERN", uno degli "European Reference Network-ERN", promosso da EU per promuovere il network tra i Centri di Eccellenza in Europa sulle malattie rare.

L'unità operativa Cellule Staminali e Immunoterapia è composta dalla dott.ssa Marta Serafini (capo unità), dott.ssa Alice Pievani (ricercatrice), dott.ssa Sarah Tettamanti (ricercatrice), dott.ssa Marta Biondi (Post-Doc), dott.ssa Samantha Donsante (Post-Doc), dott.ssa Chiara Tomasoni (studentessa di dottorato DIMET), dott.ssa Corinne Arsuffi (studentessa di dottorato DIMET), dott.ssa Carlotta Guzzetti (studentessa di dottorato DIMET), dott.ssa Ilaria Pisani (biologa).

Pubblicazioni scientifiche Unità Serafini 2022-2023

1) Pievani A, Granata V, Desantis G, Antolini L, Ornaghi S, Galleu A, Biondi A, Gentner B, *Dazzi F* [#]*, ***Serafini M*** [#]***.**CD 14 positive cells accelerate hematopoietic stem cell engraftment.
*Bone Marrow Transplant.*2022 Jun;57(6):942-948 oi: 10.1038/s41409-022-01662-1.

2)Palmisano B, Labella R, Donsante S, Remoli C, Spica E, Coletta I, Farinacci G, Dello Spedale Venti M, Saggio I, **Serafini M**, Robey P, Corsi A, *Riminucci M*. GsαR201C and estrogen reveal different subsets of bone marrow adiponectin expressing osteogenic cells.
Bone Research, 2022 Jul 19;10(1):50 doi: 10.1038/s41413-022-00220-1.

3) Dello Spedale Venti M, Palmisano B, Donsante S, Farinacci G, Adotti F, Coletta I, **Serafini M**, Corsi A, *Riminucci M*. Morphological and immunophenotypical changes of human bone marrow adipocytes in marrow metastasis and myelofibrosis.
Front in Endocrinol, 2022 Jun 8;13:882379. doi: 10.3389/fendo.2022.882379.

4) De Ponti G, Donsante S, Frigeni M, Pievani A, Corsi A, Bernardo ME, Riminucci M and **Serafini M*****. MPSI Manifestations and Treatment Outcome: Skeletal Focus.
International Journal of Molecular Sciences, 2022 Sep 22;23(19):11168 doi: 10.3390/ijms231911168.

5)Caruso S, *De Angelis B*, Del Bufalo F, Ciccone R, Donsante S, Volpe G, Manni S, Guercio M, Pezzella M, Iaffaldano L, Silvestris D, Sinibaldi M, DiCecca S, Pitisci A,Velardi E, Merli P, Algeri M, Lodi M, Paganelli V, **Serafini M**, Riminucci M, Locatelli F, QuintarelliC. Safe and effective off-the-shelf immunotherapy based on CAR.CD123-NK cells for the treatment of acute myeloid leukaemia.
J Hematol Oncol 2022 Nov 5;15(1):163 doi: 10.1186/s13045-022-01376-3.

6)Perriello VM, Rotiroti MC, Pisani I, Galimberti S, Alberti G, Pianigiani G, Ciaurro V, Marra A, Sabino M, Tini V, Spinozzi G, Mezzasoma F, Morena F, Martino S, Salerno D, Ashby JF, Wingham B, **Serafini M**, Martelli MP, Falini B, Biondi A, Tettamanti S. IL3-zetakine combined with a CD33 costimulatory receptor as a Dual CAR approach for safer and selective targeting of AML.
Blood Adv. 2022 Dec 15;bloodadvances.2022008762.doi: 10.1182/bloodadvances.2022008762.

7)Doffini A**,** Forcato C, Mangano C, Lattuada D, Aversa R, Maranta C, Giovannone ED, Buson G, Bolognesi C, Maiocchi R, Dori M, Jamal L, Ahmad RB, Yeo GSH, Yeo TW, Saragozza S, Silipigni R, **Serafini M**, Biondi A, Perego S, Vergani P, Ferrazzi E, Ricciardi-Castagnoli P, Musci TJ, Grati FR. Isolation of single circulating trophoblasts from maternal circulation for noninvasive fetal copy number variant profiling.
Prenat Diagn. 2023 Jan;43(1):14-27. doi: 10.1002/pd.6275.

8) Biondi M, Tettamanti S, Galimberti S, Cerina B, Tomasoni C, Piazza R, Donsante S, Bido S, Perriello VM, Broccoli V, Doni AA, Dazzi F, Mantovani A, Dotti G, Biondi A, Pievani A,**Serafini M*****. Selective homing of CAR-CIK cells to the bone marrow niche enhances control of the Acute Myeloid Leukemia burden.
Blood. 2023 Feb 14;blood.2022018330doi: 10.1182/blood.2022018330.

9) Donsante S, Siciliano G, Ciardo M, Palmisano B, Messina V, de Turris V, Farinacci G, **Serafini M,** Silvestrini F, Corsi A, *Riminucci M*, *Alano P*. An *in vivo* humanized model to study homing and sequestration of Plasmodium falciparum transmission stages in the bone marrow.
Frontiers in Cellular and Infection Microbiology, in press (lettera di accettazione allegata).

10) Tomasoni C, Pievani A, Rambaldi B, Biondi A*****, **Serafini M*****. A question of frame: the role of the bone marrow stromal niche in myeloid malignancies.
Hemasphere, in press

11) Alberti G, Arsuffi C, Pievani A, Salerno D, Mantegazza F, Dazzi F, Biondi A, Tettamanti S[#], **Serafini M[#]*****.
Engineering Tandem CD33xCD146 CAR CIK (Cytokine-Induced Killer) cells to target the Acute Myeloid Leukemia niche. *Frontiers in Immunology*, in press

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

L'Unità della Dr.ssa G. D'Amico (Ricercatrice della Fondazione Tettamanti) è focalizzata all'identificazione dei segnali derivati dallo stroma che guidano il mantenimento, l'evoluzione nonchéla 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 sei linee di ricerca:

A) Studiare i meccanismi di promozione della leucemia da parte di ActivinA, analizzandoil ruolo potenziale di ActivinA sulla vescicolazione cellularedi BCP-ALL.

In particolare abbiamo scoperto che la linea leucemica697 sono in grado di produrre entrambe le Dopo stimolazione con ActA, le cellule 697 hanno presentato un aumento significativo della produzione di esosomi e micro-vescicole. Inoltre, ActA ha anche modificato il contenuto dei miRNA delle VE. Fra quelli modulati, il miR-491-5p è risultato aumentato da ActA di 3 volte nelle VE ($p<0.0001$), e di 1,5 volte a livello intracellulare. A proposito del suo ruolo, dati di letteratura lo correlano alla chemio-resistenza in diversi tumori. Per indagare l'azione chemio-protettiva nella LLA-B, abbiamo svolto esperimenti in cui cellule 697, pre-stimolate o no con ActA, sono state trattate con Asparaginasi, un chemioterapico utilizzato per il trattamento di pazienti LLA-B pediatrici. Sorprendentemente, ActA è stata in grado di aumentare la vitalità delle cellule 697 trattate con ASNasi rispetto alle cellule controllo. Inoltre, la combinazione ActA+ASNasi è risultata superiore rispetto ai singoli stimoli nell'aumentare miR-491-5p nelle cellule 697 (FC=2.5, $p=0.0078$ rispetto controllo, n=8). Per confermare il coinvolgimento del miR-491-5p nella chemio-resistenza, ne abbiamo modulato l'espressione tramite trasfezione di un inibitore specifico, ottenendo una riduzione del 40% dell'azione anti-apoptotica di ActA. Tramite il database miR-System abbiamo predetto il coinvolgimento di miR-491-5p nell'apoptosi mediata da p53. Per investigare i potenziali target di miR-491-5p, attraverso dati di espressione genica su cellule 697, abbiamo dimostrato che ActA riduce del 30% l'espressione di TP53-AIP1 ($p=0.001$), una molecola pro-apoptotica del pathway di p53. In accordo, il database miR-Walk suggerisce TP53-AIP1 come target diretto di miR-491-5p. La modulazione TP53-AIP1 da parte di miR-491-5p è stata confermata sperimentalmente: l'inibizione di miR-491-5p è in grado di aumentare di 5,8 volte l'espressione di TP53-AIP1, mentre la trasfezione di un mimic (miR-491-5p sintetico) di diminuirne i livelli del 20%. In conclusione, abbiamo dimostrato che ActA aumenta la produzione di vescicole ricche di miR-491-5p, un mediatore cruciale per svolgere la sua azione chemio-protettiva. Studi futuri saranno necessari per investigare se la chemio-resistenza possa essere trasferita anche a distanza grazie alle VE. Attualmente stiamo analizzando il cargo di mRNA(in Collaborazione con la Dott.ssa Bresolin, Padova)

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

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 stimolate con le cellule leucemiche si 'convertono' al fine di secernere l'asparagina (Asn), aumentare l'espressione deltrasportatore 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 asparginasi.Studi futuri saranno necessari per bloccare questa via di protezione, mediante inibitori specifici.

C) Studio della matrice extracellulare nella nicchia leucemica

Pochi studi mostrano nei tumori solidi come la matrice extracellulare possa supportare la crescita tumorale. Lo scopo del nostro studio è quello di caratterizzare la matrice extracellulare nella nicchia leucemica. In particolare analizzeremo la matrice prodotta dalle MSC leucemiche, dalle MSC stimolate con Activina e dalle MSC co-coltivate *in vitro*con i blasti leucemici sia a livello proteico (in Collaborazione con il Dott.

Martano, Istituto Humanitas) che della sua rigidità (Prof. Mantegazza Università Milano Bicocca) e confermeremo quanto osservato su biopsie ossee di pazienti leucemici

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

A tale scopo abbiamo innanzitutto creato un modello di leucemia umana in topi immunodeficienti, usando la linea cellulare NALM-6. In tale modello,i livelli di AttivinaA nel sangue sono risultati direttamente correlati conla percentuale di cellule leucemiche infiltranti il midollo. La somministrazione di una trappola molecolare per AttivinaAè stata in grado di prolungare significativamente la sopravvivenza dei topi leucemici, riducendoin maniera drastical'infiltrato leucemico nel midollo ed in organi extramidollari quali la milza, dove la malattiaè stata quasi completamenteeradicata del 90%.Inoltre, abbiamo osservato cheil blocco di AttivinaA era in grado di aumentare significativamente l'efficacia del desametasone, un chemioterapico impiegato nel trattamento di prima linea della LLA-B pediatrica. La combinazione del bloccante di AttivinaA e desametasone ha infatti prodotto un notevole prolungamento della sopravvivenza dei topi leucemici, aumentatada 23 giorni del gruppo controllo a 37 giorni. Inoltre,i due farmaci hanno mostrato un effetto sinergico nel ridurre l'infiltrato leucemico a livello di meningi e midollo. Infine, in studi in vitroabbiamo dimostrato che,oltre all'aumento della migrazione precedentemente osservato, AttivinaAè in gradodi esercitare un effetto anti-apoptotico su alcuni sottogruppi di LLA-B, modulando l'espressione di BCL-2, BAX e BAK, e riducendo la produzione di specie reattive dell'ossigeno in risposta al desametasone.

In conclusione, il targeting della nicchia midollare leucemica mediante il sequestro farmacologico di AttivinaA potrebbe essere una strategia promettente per migliorare i tassi di cura dei pazienti pediatrici con LLA-B, refrattari alla chemioterapia tradizionale.

E)Targeting della componente macrofagica protumorale nella nicchia leucemica e suo bersaglio mediante la generazione di recettori chimerici (CAR) (E. Dander)

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.Abbiamo dimostrato 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-CD19colpirannoquindidirettamente 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.

F)Studio dell'effetto della leucemia sul microambiente del SNC utilizzando un modello *ex vivo* di fettine cerebrali corticali organotipiche.

La leucemia linfoblastica acuta (LLA) è la forma più comune di neoplasia infantile, in circa il 40% delle recidive, il sistema nervoso centrale (SNC) è coinvolto, da solo o in combinazione con altri siti, rappresentando quindi ancora un importante clinical need. Abbiamo messo a punto un modello *ex vivo* per studiare le interazioni delle cellule di leucemia con il tessuto cerebrale tramite microiniezione della leucemia nella fettina cerebrale prganotipica. I nostri dati indicano che il pretrattamento con ActivinA promuove una maggiore proliferazione di una linea cellulare (NALM-6) nelle fette cerebrali rispetto alle cellule leucemiche non stimolate. Inoltre leNALM-6 pretrattate con ActivinA inducono modificazioni microgliali, caratterizzate da una diminuzione della reattività e un'induzione di fenotipo anti-nfiammatorio, favorendo la sopravvivenza e la proliferazione delle cellule leucemiche, così come la riduzione di geni ad attività infiammatoria ed un aumento di geni immunosoppressivi, pro-leuvemici. Il nostro modello può aiutare a rispondere a importanti domande sui cambiamenti cerebrali dopo l'infiltrazione di cellule leucemiche e potrebbe accelerare il processo di screening dei farmaci per i pazienti leucemici con coinvolgimento del SNC.

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 networktra i Centri di Eccellenza in Europa sulle malattie rare.
Le attività di ricerca si sono focalizzate su tre progetti:

A) caratterizzare il metabolismodelle SDS-MSC

È noto come un'angiogenesi patologica sia spesso accompagnata da alterazioni metaboliche.Abbiamo analizzato la fosforilazione ossidativa, in particolare le vie dei complessi I-III-IV e II-III-IV.Osserviamo che le SDS-MSC consumano il 60% in meno dell'ossigeno e sintetizzano il 60% in meno di ATPrispetto alle HD-MSC. Tale difetto mitocondriale è dovuto in particolare ad una riduzione del61% dell'attività del complessoIV . Inoltre, il rapporto ATP/AMP intracellulare èsignificativamente inferiore negli SDS rispetto agli HD e correla ad un aumento dell'attività della lattato deidrogenasi(LDH). Infine, abbiamo anche dimostrato che la quantità di ROS nelle SDS-MSC è superiore del 27%rispetto agli HD e che il livello di perossidazione lipidica è il doppio rispetto ai controlli.

B) studio dell'effetto di antiossidanti (DMSO e NAC)sul metabolismodelle SDS-MSC.

Abbiamo stimolato le SDS MSC per 48h con 0.05% di dimentilsolfossido (DMSO), molecola che a basseconcentrazioni agisce come antiossidante riducendo in particolare i livelli di perossidazione lipidica.Sorprendentemente, le SDS-MSC stimolate recuperano significativamente la capacità di formare strutturesimil-capillari su Matrigel. In aggiunta, la reversione angiogenica delle SDS-MSC è accompagnata daun ripristino metabolico (n=6). Le SDS-MSC stimolate aumentano infatti il consumo di ossigeno e la sintesidi ATP in entrambe le vie mitocondriali, oltre che ripristinare l'attività del complessoIV. Inoltre, il DMSOriporta il rapporto ATP/AMP e l'attività della LDH al livello dei controlli e riduce significativamente lo stressossidativo delle SDS-MSC.Al fine di confermare che l'effetto del DMSO sia dovuto specificatamente alle sue proprietà antiossidanti,abbiamo trattato le SDS-MSC per 48h con N-acetilcisteina (NAC), noto antiossidante. Le SDS-MSCripristinano il proprio difetto metabolico e recuperano il potenziale angiogenico in modo paragonabile altrattamento con il DMSO.In conclusione, abbiamo quindi dimostrato come l'alterato metabolismo potrebbe essere alla base deldifetto angiogenico osservato nelle SDS-MSC. Inoltre, l'uso di antiossidanti è in grado di ripristinare ilquadro metabolico e l'incapacità angiogenica delle SDS-MSC, aprendo così la strada a nuove strategie

C) Messa a punto di un modello murino per studiare l'angiogenesi *in vivo*

Da dati ottenuti dai collaboratori di Roma (Prof. Reminucci, Università la Sapienza) è emerso che le SDS MSC non sono in grado di generare vasi funzionali quando impiantati in un plug di matrigel in presenza di cellule endoteliali, rispetto alle MSC da donatori sani. Stiamo mettendo a punto questo modello in topi NSG qui a Monza per testare l'efficacia degli antiossidanti sulla capacità delle MSC SDS di formare vasi.

L'Unità della Dr.ssa D'Amico è costituita da unastaff scientist (Erica Dander), da 1 Post-Doc (Alessandra Fallati),4 PhD Students(Clarissa Gervasoni, Eugenia Licari, Rita Starace, Alice Giussani), e da una studentessa inBiotecnologie (Alice Giussani).

Pubblicazioni scientifiche Unità D'Amico

The chemerin/CMKLR1 axis regulates intestinal graft-versus-host disease.
Dander E, Vinci P, Vetrano S, Recordati C, Piazza R, Fazio G, Bardelli D, Bugatti M, Sozio F, Piontini A, Bonanomi S, Bertola L, Tassistro E, Valsecchi MG, Calza S, Vermi W, Biondi A, Del Prete A, Sozzani S, **D'Amico G**.JCI Insight. 2023 Mar 8;8(5):e154440. doi: 10.1172/jci.insight.154440.

Mesenchymal stromal cells cultured in physiological conditions sustain citrate secretion with glutamate anaplerosis.
Taurino G, Deshmukh R, Villar VH, Chiu M, Shaw R, Hedley A, Shokry E, Sumpton D, Dander E, **D'Amico G**, Bussolati O, Tardito S.Mol Metab. 2022 Sep;63:101532. doi: 10.1016/j.molmet.2022.101532. Epub 2022 Jun 22.

Mesenchymal Stromal Cells (MSCs): An Ally of B-Cell Acute Lymphoblastic Leukemia (B-ALL) Cells in Disease Maintenance and Progression within the Bone Marrow Hematopoietic Niche.
Fallati A, Di Marzo N, **D'Amico G**§, Dander E§.Cancers (Basel). 2022 Jul 6;14(14):3303. doi: 10.3390/cancers14143303.§co-last name

Effect of Vagus Nerve Stimulation on Blood Inflammatory Markers in Children with Drug-Resistant Epilepsy: A Pilot Study.
Baro V, Bonavina MV, Saettini F, **D'Amico G**, Trezza A, Denaro L, Grioni D, Landi A.Children (Basel). 2022 Jul 29;9(8):1133. doi: 10.3390/children9081133.

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).

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 HumanitasUniversity.

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 PediatricHematologyOncology) hanno trovate nel 2019 il riconoscimento come Centro dipartimentale di "Global PediatricMedecine". 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 dal Paraguay e dal Guatemala, 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 e della citofluorimentria.

Monza, 29/06/2023
L'Organo Amministrativo,
Il Presidente Dr. Luigi Roth

Il Direttore Scientifico Prof. Andrea Biondi