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' (Dott. Giovanni Cazzaniga)

A. Progetti di ricerca

1. Caratterizzazione e drugtargeting di sottogruppi 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: nuovo grant PRIN a Cazzaniga dal 2024)
Task 1.1. 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.
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'stato pubblicato il lavoro incentrato sull'applicazione di High Troughput Screening (collaborazione con Prof. Borkhardt, Dusseldorf, Germania) 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 il ricollocamento di farmaci in sottogruppi BCP-ALL resistenti alle terapie convenzionali. (Oikonomou A, et al. BiochemPharmacol. 2023;217:115809)
E' in seconda revisione un ulteriore lavoro in cui è stata esplorata la combinazione di più farmaciquale 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. (Oikonomou A, et al. Heliyon, in revision)
Task 1.2.Targeting specifico di aberrazioni nel contesto del profilo di espressione genica Ph-like(Project Leader: Grazia Fazio)
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. Targetingdei riarrangiamenti del gene PAX5
Nel lavoro pubblicato di estesa caratterizzazione di 289 casi pediatrici di BCP-ALL arruolati consecutivamente in Italia nei protocolli AIEOP-BFM ALL2000/R2006, il gene PAX5 è risultato alterato nel 54,4% dei casi Ph-like. Stiamo caratterizzando ulteriormente i casi PAX5t, per esplorare il loro possibile trattamento farmacologico con farmaci già approvati dalla FDA e noti per essere ligandidi LCK.
1.2.2. Targeting deiriarrangiamenti di JAK2 (PostDoc Manuel Quadri, borsa triennale AIRC PostDoc)

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.
Grazie al periodo svolto presso il laboratorio di K.Davis a Stanford, stanno proseguendo gli esperimenti di analisi single cell con CytOFF e del profilo metabolico cellulare associato a riarrangiamento di JAK2.
(Quadri et al. Manoscritto sottomesso per pubblicazione)
(finanziamento grantAIRC IG a Fazio dal 2024)
Task 1.3. Ruolo del gene MSI2 nella leucemia linfoblastica acuta infant con riarrangiamento del gene MLL(Project Leader: Michela Bardini, PostDoc Luigia Valsecchi)
Scopo generale del progetto è studiare il ruolo di Musashi-2 (MSI2) in LAL infantMLLr, sottotipo di leucemia ancora gravato da una prognosi molto sfavorevole.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.
(Valsecchi L. et al., manoscritto in sottomissione per pubblicazione)
(finanziamento grantFight Kids Cancer 2023 a Cazzaniga)

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

(Finanziamento Grant AIRG IG a Cazzaniga 2024-2028)
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)
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 metodologiafuzzylogicper 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, Spainper 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, nuovo grant AIRC-IG 2024-28)

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

(Finanziamento Grant AIRG IG a Cazzaniga 2024-2028)
E' sempre più evidente 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.

A protocollo chiuso, stiamo raccogliendo i dati del questionario per tutti i bambini italiani con LAL arruolati al protocollo AIEOP-BFM ALL2017 (n=1415). Da queste risulta che 208 pazienti, il 14.7% dei pazienti arruolati al protocollo, presenta almeno un criterio clinico meritevole di approfondimento nel sospetto di una condizione predisponente i tumori. In particolare, 64/208 (30%) presenta anamnesi familiare positiva per ricorrenza di tumori giovanili. In 146/208 (70%) si rileva almeno una comorbidità o una diagnosi genetica nota. A tutti i pazienti è stata proposta una consulenza genetica. 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.
(Abstract per Congresso AIEOP 2024 e Congresso SIGU 2024)

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.

E' in corso uno studio internazionale 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 e CAR (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 abbiamo descritto un ruolo del gene STAG1 nella leucemogenesi e nell'aumentato rischio di insorgenza di disordini emato-oncologici (Saitta et al. Blood Cancer J. 2022) e collaborato allo studio del gene RAD21 (Schedel A, et al. Int J Mol Sci. 2022). 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 il Dr. Francesco Saettini/Dr.ssa Fabiola Guerra (PhDStudent), della Clinica Pediatrica per la caratterizzazione di pazienti con immunodeficienza con sospetto di base genetica.

L'Unità di Genetica della Leucemia, diretta dal Dr.Cazzaniga è composta da 3 Project Leader (M.Bardini, G.Fazio, C.Palmi), 3 Post Doc (M.Bertagna, M.Quadri, L.Valsecchi), 4PhDstudent(D.Acunzo, S.Procopio, S. Rebellato, F. Guerra), 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/Grazia Fazio)

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 Molecolare e di Citogenetica del Centro Ricerca Tettamanti di Monza vengono riferiti il materiale per le analisi ed i dati dei 400 bambini ed adolescenti affetti da leucemia acuta linfoblastica in Italia e oltre il 10% direttamente per le cure.
Presso il Centro Ricerca Tettamanti vengono eseguite le indagini molecolari e di malattia residua minima necessari per l'assegnazione di tutti i pazienti italiani con LAL al più appropriato braccio di protocollo terapeutico, in funzione della fascia di rischio.
Nello stesso contesto di genetica molecolare, il Centro Ricerca Tettamanti è promotore di progetti di ricerca, associati ai protocolli clinici, per la caratterizzazione dell'eterogeneità genomica di sottogruppi di pazienti AIEOP con diversa risposta alla terapia.
Identificazione di alterazioni prognostiche e target terapeutici nelle LAL pediatriche (Dr. G. Cazzaniga, Dr.ssa G.Fazio)
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).

Collaborazione internazionale: 4 progetti sono stati sottoposti al Gruppo di lavoro 'Ponte di Legno' su sottogruppi rari di leucemie:
- Fusioni geniche in pazienti Infant con KMT2A wild type: caratterizzazione e outcome
- Fusioni geniche che coinvolgono il gene PAX5: caratterizzazione e outcome
- Fusioni dei geni delle coesine in ALL: caratterizzazione e outcome
- Varianti di TP53 in ALL ipodiploide: impatto su trapianto, chemioterapia e seconde neoplasie

Pubblicazioni scientifiche Unità Cazzaniga 2023-2024

Meyer C, Larghero P, Almeida Lopes B, Burmeister T, Gröger D, Sutton R, Venn NC, Cazzaniga G, CorralAbascal 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 derVelden 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

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

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, TeKronnie 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 Lymphoblastic Leukemia. Hemasphere. 2023 May 26;7(6):e892. doi: 10.1097/HS9.0000000000000892. eCollection 2023 Jun. PMID: 37304931

Lopes BA, Meyer C, Bouzada H, Külp M, Maciel ALT, Larghero P, Barbosa TC, Poubel CP, Barbieri C, Venn NC, Pozza LD, Barbaric D, Palmi C, Fazio G, Saitta C, Aguiar TF, Lins MM, Ikoma-Colturato MRV, Schramm M, Chapchap E, Cazzaniga G, Sutton R, Marschalek R, Emerenciano M. The recombinome of IKZF1 deletions in B-cell precursor ALL. Leukemia. 2023 Aug;37(8):1727-1731. doi: 10.1038/s41375-023-01935-8. Epub 2023 Jun 29. PMID: 37386080

Hunger SP, Tran TH, Saha V, Devidas M, Valsecchi MG, Gastier-Foster JM, Cazzaniga G, Reshmi SC, Borowitz MJ, Moorman AV, Heerema NA, Carroll AJ, Martin-Regueira P, Loh ML, Raetz EA, Schultz KR, Slayton WB, Cario G, Schrappe M, Silverman LB, Biondi A. Dasatinib with intensive chemotherapy in de novo paediatric Philadelphia chromosome-positive acute lymphoblastic leukaemia (CA180-372/COG AALL1122): a single-arm, multicentre, phase 2 trial. Lancet Haematol. 2023 Jul;10(7):e510-e520. doi: 10.1016/S2352-3026(23)00088-1. PMID: 37407142

Zuna J, Hovorkova L, Krotka J, Winkowska L, Novak Z, Sramkova L, Stary J, Trka J, Cazzaniga G, Cario G, Zaliova M. Posttreatment positivity of BCR::ABL1 in acute lymphoblastic leukemia: Should we keep track? Am J Hematol. 2023 Oct;98(10):E269-E271. doi: 10.1002/ajh.27022. Epub 2023 Jul 14. PMID: 37449465

Barone C, Orsenigo R, Cazzola A, D'Errico E, Patelli A, Quattrini G, Vergani B, Bombelli S, De Marco S, D'Orlando C, Bianchi C, Leone BE, Meneveri R, Biondi A, Cazzaniga G, Rabbitts TH, Brunelli S, Azzoni E. Hematopoietic Stem Cell (HSC)-Independent Progenitors Are Susceptible to Mll-Af9-Induced Leukemic Transformation. Cancers (Basel). 2023 Jul 14;15(14):3624. doi: 10.3390/cancers15143624. PMID: 37509285

Caserta C,*Nucera S,* Barcella M, Fazio G, Naldini MM, Pagani R, Pavesi F, Desantis G, Zonari E, D'Angiò M, Capasso P, Lombardo A, Merelli I, Spinelli O, Rambaldi A, Ciceri F, Silvestri D, Valsecchi MG, Biondi A, Cazzaniga G,* Gentner B.* miR-126 identifies a quiescent and chemo-resistant human B-ALL cell subset thatcorrelates with minimalresidualdisease. Leukemia. 2023 Oct;37(10):1994-2005. doi: 10.1038/s41375-023-02009-5. Epub 2023 Aug 28. PMID: 37640845

Oikonomou A, Valsecchi L, Quadri M, Watrin T, Scharov K, Procopio S, Tu JW, Vogt M, Savino AM, Silvestri D, Valsecchi MG, Biondi A, Borkhardt A, Bhatia S, Cazzaniga G, Fazio G, Bardini M, Palmi C. High-throughput screening as a drug repurposing strategy for poor outcome subgroups of pediatric B-cell precursor Acute Lymphoblastic Leukemia. BiochemPharmacol. 2023 Nov;217:115809. doi: 10.1016/j.bcp.2023.115809. Epub 2023 Sep 17. PMID: 37717691

Saettini F, Guerra F, Fazio G, Bugarin C, McMillan HJ, Ohtake A, Ardissone A, Itoh M, Giglio S, Cappuccio G, Giardino G, Romano R, Quadri M, Gasperini S, Moratto D, Chiarini M, Akira I, Fukuhara Y, Hayakawa I, Okazaki Y, Mauri M, Piazza R, Cazzaniga G, Biondi A. Antibody Deficiency in Patients with Biallelic KARS1 Mutations. J ClinImmunol. 2023;43:2115-2125. Correction in J ClinImmunol. 2023 Nov;43(8):2126

Hess JF, Kotrová M, Fricke B, Songia S, Rigamonti S, Cavagna R, Tosi M, Paust N, Langerak AW, Spinelli O, Cazzaniga G, Brüggemann M, Hutzenlaub T. Clinical pilot study on microfluidic automation of IGH-VJ library preparation for next generation sequencing. ClinChem Lab Med. 2023 Dec 29. doi: 10.1515/cclm-2023-1346. Online ahead of print. PMID: 38153095

Crespiatico I, Zaghi M, Mastini C, D'Aliberti D, Mauri M, Mercado CM, Fontana D, Spinelli S, Crippa V, Inzoli E, Manghisi B, Civettini I MedicalDoctor, Ramazzotti D, Sangiorgio V, Gengotti M, Brambilla V, Aroldi A, Banfi F, Barone C, Orsenigo R, Riera L, Riminucci M, Corsi A, Breccia M, Morotti A, Cilloni D, Roccaro AM, Sacco A, Stagno F, Serafini M, Mottadelli F, Cazzaniga G, Pagni F, Chiarle R, Azzoni E, Sessa A, Gambacorti-

Passerini CB, Elli EM, Mologni L, Piazza R. First-hit SETBP1 mutations cause a myeloproliferativedisorder with bone marrowfibrosis. Blood. 2024 Apr 4;143(14):1399-1413. doi: 10.1182/blood.2023021349. PMID: 38194688

Buldini B, Varotto E, Maurer-Granofszky M, Gaipa G, Schumich A, Brüggemann M, Mejstrikova E, Cazzaniga G, Hrusak O, Szczepanowski M, Scarparo P, Zimmermann M, Strehl S, Schinnerl D, Zaliova M, Karawajew L, Bourquin JP, Feuerstein T, Cario G, Alten J, Möricke A, Biffi A, Parasole R, Fagioli F, Valsecchi MG, Biondi A, Locatelli F, Attarbaschi A, Schrappe M, Conter V, Basso G, Dworzak MN. CD371+ pediatric B-cell acute lymphoblastic leukemia: propensity to lineage switch and slow early response to treatment. Blood. 2024 Apr 25;143(17):1738-1751. doi: 10.1182/blood.2023021952. PMID: 38215390

Elli EM, Mauri M, D'Aliberti D, Crespiatico I, Fontana D, Redaelli S, Pelucchi S, Spinelli S, Manghisi B, Cavalca F, Aroldi A, Ripamonti A, Ferrari S, Palamini S, Mottadelli F, Massimino L, Ramazzotti D, Cazzaniga G, Piperno A, Gambacorti-Passerini C, Piazza R. Idiopathicerythrocytosis: a germlinedisease? ClinExp Med. 2024 Jan 20;24(1):11. doi: 10.1007/s10238-023-01283-y. PMID: 38244120 Free PMC article.

Conter V, Valsecchi MG, Cario G, Zimmermann M, Attarbaschi A, Stary J, Niggli F, DallaPozza L, Elitzur S, Silvestri D, Locatelli F, Möricke A, Engstler G, Smisek P, Bodmer N, Barbaric D, Izraeli S, Rizzari C, Boos J, Buldini B, Zucchetti M, von Stackelberg A, Matteo C, Lehrnbecher T, Lanvers-Kaminsky C, Cazzaniga G, Gruhn B, Biondi A, Schrappe M. Four Additional Doses of PEG-L-Asparaginase During the Consolidation Phase in the AIEOP-BFM ALL 2009 Protocol Do Not Improve Outcome and Increase Toxicity in High-Risk ALL: Results of a Randomized Study. J ClinOncol. 2024 Mar 10;42(8):915-926. doi: 10.1200/JCO.23.01388. Epub 2023 Dec 14.PMID: 38096462

TrettiParenzan C, Dal Molin A, Longo G, Gaffo E, Buratin A, Cani A, Boldrin E, Serafin V, Guglielmelli P, Vannucchi AM, Cazzaniga G, Biondi A, Locatelli F, Meyer LH, Buldini B, Te Kronnie G, Bresolin S, Bortoluzzi S. Functionalrelevance of circRNAaberrantexpression in pediatric acute leukemia with KMT2A::AFF1 fusion. Blood Adv. 2024 Mar 12;8(5):1305-1319. doi: 10.1182/bloodadvances.2023011291. PMID: 38029383

Kotrova M, Fronkova E, Svaton M, Drandi D, Schön F, Hoogeveen P, Hancock J, Skotnicova A, Schilhabel A, Eckert C, Clappier E, Cazzaniga G, Schäfer BW, van Dongen JJM, Ritgen M, Pott C, van der Velden VHJ, Trka J, Brüggemann M. The gray area of RQ-PCR-based measurable residual disease: subdividing the "positive, below quantitative range" category. Leukemia. 2024 May 17. doi: 10.1038/s41375-024-02265-z. Online ahead of print. PMID: 38760480

van der Velden VHJ, Dombrink I, Alten J, Cazzaniga G, Clappier E, Drandi D, Eckert C, Fronkova E, Hancock J, Kotrova M, Kraemer R, Montonen M, Pfeifer H, Pott C, Raff T, Trautmann H, Cavé H, Schäfer BW, van Dongen JJM, Trka J, Brüggemann M; EuroMRD Consortium. Analysis of measurable residual disease by IG/TR gene rearrangements: quality assurance and updated EuroMRD guidelines. Leukemia. 2024 Jun;38(6):1315-1322. doi: 10.1038/s41375-024-02272-0. Epub 2024 May 14. PMID: 38744919

Hess JF, Kotrová M, Fricke B, Songia S, Rigamonti S, Cavagna R, Tosi M, Paust N, Langerak AW, Spinelli O, Cazzaniga G, Brüggemann M, Hutzenlaub T. Clinical pilot study on microfluidic automation of IGH-VJ library preparation for next generation sequencing. ClinChem Lab Med. 2023 Dec 29;62(7):e164-e167. doi: 10.1515/cclm-2023-1346. Print 2024 Jun 25. PMID: 38153095

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

A. Progetti di ricerca

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

L'avvento delle cellule CAR T ha rivoluzionato il trattamento della leucemia linfoblastica acuta a cellule B (B-ALL) e delle neoplasie ematologiche. Le cellule CAR T sono linfociti T ingegnerizzati per esprimere recettori chimerici (CAR). Le nostre ricerche in questo ambito si sono focalizzate sulle CAR T dirette contro il CD19 nel trattamento delle neoplasie ematologiche a cellule B recidive/refrattarie ai trattamenti convenzionali. Una delle maggiori criticità è l'emergenza di recidive di malattia CD19 negative dopo trattamento con CAR T.In questo contesto il nostro gruppo ha sta lavorando sulla ricerca di nuovi target specifici della B-ALL. Da questa ricerca sono emersi due marcatori, il CD22 ed il BAFF-R. Dopo aver sviluppato i singoli CAR ed averli testati in modelli di malattia in vitro ed in vivo ottenendo dati consistenti circa la loro efficacia, abbiamo sperimentato un approccio multi-targeting. Il primo si avvale della co-elettroporazione, un metodo per cui si riesce ad ottenere attraverso un solo processo produttivo, una popolazione CART eterogenea composta da cellule esprimenti solo il CD22 CAR o il BAFFRCAR ed una popolazione esprimente entrambi i CAR. Questa soluzione ho mostrato un'alta efficacia anti-tumorale in vitro ed in vivo ed un vantaggio rispetto all'utilizzo di prodotti CAR anti-CD22 ed anti-BAFF-R monospecifici. Una seconda strategia in sperimentazione è quella di costruire un CAR in grado di riconoscere entrambi gli antigeni, il (tandem CAR) che è tuttora oggetto di sviluppo nel nostro laboratorio. Questo argomento è stato oggetto del progetto di dottorato del Dottor Alex Moretti affiancato dalla Dott.ssa Beatrice Landoni (tesi discussa a Febbraio 2024) e sarà oggetto di una pubblicazione nel corso del 2024.

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

Al fine di una migliore comprensione dei fattori biologici determinanti l'efficacia e la durata dell'azione dei linfociti CAR T in vivo abbiamo ipotizzato che vi possano essere differenze rilevanti nel trascrittoma delle cellule CAR T che persistono a lungo termine rispetto a quello dei linfociti CAR T che perdono la loro capacità di espansione e durata. A questo scopo utilizzeremo una tecnica di Single-cell RNA sequencing per indagare il microambiente midollare, la componente della malattia residua e le cellule CAR T. Gli esperimenti sono stati condotti in collaborazione con il Prof. M. Pagani (IFOM, Milano). Sono utilizzati 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 abbiamo indagato i 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. Inoltre abbiamo osservato che il signalling WNT/β-catenina era associata a espansione 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 e e 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 conseguenza di una generale soppressione immunitaria. In conclusione, possiamo ipotizzare che le cellule CAR T mediante l'attivazione mieloide attivano pathways immunitari di deregolazione 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 corpo del progetto di dottorato DIMET della dottoressa Marianna Ponzo (discusso in aprile 2023) e sarà oggetto di una pubblicazione nel 2024.

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

Nell'ambito della nostra collaborazione con il consorzio europeo EUROFLOW (in collaborazione con il Prof. Alberto Orfao, Salamanca) 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 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'immunofenotipo delle 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. Gli stessi pannelli sono stati utilizzati anche per la caratterizzazione dei lotti di cellule CARCIK-CD19 prodotte dal Laboratorio Verri e verrà estesa ai lotti prodotti dal Centro di Terapia Cellulare G. Lanzani di Bergamo . Questo progetto è condotto dalla dott.ssa Chiara Buracchi.

4.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 delle LLA-B e delle LLA-Te sono condotti dalle dott.sse Chiara Buracchi e Cristina Bugarin.

La rilevazione mediante citometrica a flusso (FC) della malattia residua minima (MRD) è un parametro cruciale negli attuali protocolli terapeutici utilizzati nel trattamento della LLA. Recentemente abbiamo partecipato allo sviluppo di pannelli di anticorpi monoclonali in uno sforzo collaborativo all'interno del consorzio
B-ALL: Il pannello a 12 parametri è stato validato insieme al data base che consentirà il gating automatico delle popolazioni cellulari di interesse e l'inesrimento del data base di riferimento (campioni normali e patologici) all'interno del software di analisi per la determinazione guidata del dato di MRD.
T-ALL: E' stato depositato un brevetto relativo al pannello utilizzato (settembre 2023).Il passo successivo sarà quello di creare un database di riferimento composto da campioni normali/rigeneranti di midollo osseo e sangue periferico. Questi saranno ulteriormente utilizzati per sviluppare uno strumento basato su software Infinicyt per l'identificazione automatica (AGI) delle popolazioni di cellule normali, distinguendole dalle cellule leucemiche e facilitando il rilevamento della MRD con un livello di sensibilità molto elevato (range 10-5- 10-6).

5.Approccio computazionale e a singola cellula per analizzare i meccanismi di resistenza alla chemioterapia nelle T-ALL pediatriche ad alto rischio

Nell'ambito dello studio della T-ALL, intendiamo indagare l'eterogeneità della risposta al trattamento clinico preliminare con Prednisone che rappresenta un fattore prognostico rilevante le cui basi molecolari e cellulari sono ancora poco note. Il nostro approccio prevede l'utilizzo di tecnologie d'avanguardia a livello di singola cellula sia alla diagnosi che nelle prime fasi della terapia. In secondo luogo, ci proponiamo di definire un modello matematico (fuzzy model) per simulare in silico la rete dinamica biomolecolare dei meccanismi apoptotici mediati dal PDN. Sulla base dei dati emersi dall'analisi a singola cellula e computazionale, ci proponiamo di identificare bersagli perseguibili da testare in vitro e in vivo in combinazione con il trattamento farmacologico convenzionale. Abbiamo già ottenuto dati preliminari su campioni primari alla diagnosi e durante il trattamento (MRD) con l'utilizzo della tecnologia di citometria di massa che confermano la notevole eterogeneità del profilo funzionale dei blasti di LLA-T e la possibilità di tracciare l'andamento dinamico di tali popolazioni durante il trattamento.

6. 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 fondamentale per individuare e trattare precocemente un rigetto o una recidiva di malattia. Recentemente abbiamo dimostrato la validità di una nuova metodica per determinare il chimerismo sfruttando l'ibridazione di specifici trascritti di RNA che vengono successivamente rilevati mediante citofluorimetria analizzando il chimerismo in pazienti trapiantati con un mismatch di sesso donatore-ricevente. La metodica è stata validata e pubblicata nel 2023 (Nucera*, Sindoni* et al., Bone MarrowTransplantation). Attualmente è in fase di proposta uno studio prospettico di valutazione mediante citofluorimetria del chimerismo nel compartimento linfocitario T in corso di immunoricostituzione dopo irradiazione total body (TBI). Lo studio verrà proposto come studio ancillare al protocollo internazionale FORUM2 che avrà inizio a partire dal 2025.

7.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 30 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. Per analizzare pannelli di tale complessità su un gran numero di pazienti abbiamo recentemente sviluppato una pipeline bioinformatica basata su FlowSOM, un algoritmo che consente di analizzare i dati di citofluorimetria in maniera unsupervised e con alta efficienza (DottorMarco Sindoni).In parallelo abbiamo ricevuto il finanziamento da parte di EuroFlow per sviluppare un pannello anticorpale innovativo nel contesto di uno studio multicentrico per l'immunoricostituzione post-HSCT nei pazienti pediatrici sottoposti a trapianto per LLA. Tale studio coinvolgerà 10 centri in Europa e sarà coordinato dalla Fondazione Tettamanti (DottoressaSilvia Nucera).

8.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 linfoglobuline (ATLG), che oltre a danneggiare il timo hanno come bersaglio anche i progenitori linfoidi. Stiamo pertanto valutando nella nostra coorte di pazienti la ricostituzione dei recentthymicemigrants (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 ATLG 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 l'utilizzo di ATLG come profilassi della GvHD impatti sulla ricostituzione del compartimento CD4 naive (manoscritto in fase di preparazione).I progetti dal 7 a 9 sono condotti dalla dottoressa Silvia Nucera con il supporto del dottor Marco Sindoni e della dottoressa AnitaToso.

9.Manipolazione genica non virale delle cellule CIK (Cytokine-Induced Killer) prodotte dal cordone ombelicale (CB) con l'obiettivo di produrre cellule CAR immediatamente disponibili per il trattamento di pazienti affetti da LLA

Il progetto in oggetto ha come obiettivo la generazione di cellule CARCIK-CD19 derivate dal sangue cordonale (CB, cord blood) quale fonte immediata per il trattamento di pazienti con LLA. Il progetto è articolato in due direzioni: i) lo svolgimento di attività di preclinica volte alla verifica della fattibilità di produzione di cellule CARCIK-CD19 a partire da sacche di CB congelate e alla loro successiva caratterizzazione sia in vitro che in vivo; ii) attività di produzione in GMP di cellule CARCIK-CD19 a scopo clinico.

10.Implementazione e semplificazione della piattaforma di manipolazione genica non virale Trasposone Sleeping Beauty per la generazione di cellule CARCIK per il trattamento delle neoplasie del sangue.

Garantire una rigorosa adesione alle linee guida delle Buone Pratiche di Fabbricazione (GMP, Good Manufacturing Practices) e la conformità normativa è imperativo durante la transizione dalla ricerca alla produzione clinica di prodotti medicinali di terapia avanzata (ATMP) come le cellule CAR T. Il notevole successo clinico della terapia con cellule CAR T nel trattamento delle neoplasie ematologiche ha evidenziato l'urgenza di implementare sistemi chiusi e/o automatizzati nel processo di produzione, rafforzando così la qualità e l'efficacia di questi prodotti. Evidenze recenti hanno indicato che, oltre allo sviluppo di cellule CAR T di nuova generazione con ulteriori modifiche genetiche, le condizioni di coltura ex vivo potrebbero influenzare sostanzialmente la funzionalità delle cellule CAR T.Questo progetto prevede l'ottimizzazione della metodologia per l'espansione delle cellule killer indotte da citochine (CIK) ingegnerizzate con il trasposone Sleeping Beauty utilizzando i dispositivi G-Rex. Diverse variabili verranno considerate ai fini dell'ottimizzazione della coltura CARCIK (G-REX vs Flask, cocktail di citochine diverse, tempi di coltura più brevi rispetto allo standard) e verrà studiato l'impatto delle diverse condizioni di coltura sul fenotipo delle cellule CAR-CIK e sulla fitness delle cellule T.

11.Lo sviluppo del protocollo clinico CARCIK Dual CAR secondo voi lo devo mettere qui?

L'Unità diretta dal DottorGiuseppe Gaipa è costituita dalla Dottoressa Chiara Buracchi, Biotecnologa, ricercatrice post-doc – Assistente di Ricerca; Dottoressa Cristina Bugarin Biologa, Assistente di Ricerca; Dottoressa Sarah Tettamanti, Biotecnologa, ricercatrice post-doc; Dottoressa Giusi Melita G., Biotecnologa, Assistente di Ricerca ;Dottor Alex Moretti, Medico, ricercatore post-doc; Dottor Marco Sindoni, biotecnologo, PhD student; Dottoressa Beatrice Landoni, biotecnologa, PhD student, dott.ssa Anita Toso, Biotecnologa, borsista Assistente di Ricerca. Inoltre è ancora attiva una collaborazione con la Dottoressa Chiara Francesca Magnani, assistant professor presso il Children Hospital di Zurigo (CH) e la Dottoressa Ponzo M. Biologa, PhD ricercatrice post-doc.

Pubblicazioni da gennaio 2022 a giugno 2024:

1. Martín-Martín L, Gutiérrez-Herrero S, Herrero-García M, Martín García-Sancho A, Yeguas A, Martín-López AÁ, López-Corral L, Pérez-López E, García-Blázquez M, Sánchez-Guijo F, Vidriales MB, Gaipa G; INCAR consortium; EuroFlow consortium; Orfao A. Impact of the kinetics of circulating anti-CD19 CAR-T cells and their populations on the outcome of DLBCL patients.Blood Cancer J. 2024 May 17;14(1):83. doi: 10.1038/s41408-024-01065-z. PMID: 38760376 Free PMC article. No abstract available.
2. Buldini B, Varotto E, Maurer-Granofszky M, Gaipa G, Schumich A, Brüggemann M, Mejstrikova E, Cazzaniga G, Hrusak O, Szczepanowski M, Scarparo P, Zimmermann M, Strehl S, Schinnerl D, Zaliova M, Karawajew L, Bourquin JP, Feuerstein T, Cario G, Alten J, Möricke A, Biffi A, Parasole R, Fagioli F, Valsecchi MG, Biondi A, Locatelli F, Attarbaschi A, Schrappe M, Conter V, Basso G, Dworzak MN. CD371-positive pediatric B-cell acute lymphoblastic leukemia: propensity to lineage switch and slow early response to treatment.
   Blood. 2024 Apr 25;143(17):1738-1751. doi: 10.1182/blood.2023021952. PMID: 38215390

3. Nucera S, Sindoni MM, Bugarin C, Villa T, Biondi A, Balduzzi A, Gaipa G. A novel flow-cytometric based method to assess post-HSCT donor chimerism exploiting RNA hybridization.Bone Marrow Transplant. 2024 Feb;59(2):171-177. doi: 10.1038/s41409-023-02143-9. Epub 2023 Nov 7. PMID: 37935782 Free PMC article.
4. Kowarsch F, Maurer-Granofszky M, Weijler L, Wödlinger M, Reiter M, Schumich A, Feuerstein T, Sala S, Nováková M, Faggin G, Gaipa G, Hrusak O, Buldini B, Dworzak MN. FCM marker importance for MRD assessment in T-cell acute lymphoblastic leukemia: An AIEOP-BFM-ALL-FLOW study group report.Cytometry A. 2024 Jan;105(1):24-35. doi: 10.1002/cyto.a.24805. Epub 2023 Oct 19. PMID: 37776305
5. Verbeek MWC, Rodríguez BS, Sedek L, Laqua A, Buracchi C, Buysse M, Reiterová M, Oliveira E, Morf D, Oude Alink SR, Barrena S, Kohlscheen S, Nierkens S, Hofmans M, Fernandez P, de Costa ES, Mejstrikova E, Szczepanski T, Slota L, Brüggemann M, Gaipa G, Grigore G, van Dongen JJM, Orfao A, van der Velden VHJ. Minimal residual disease assessment in B-cell precursor acute lymphoblastic leukemia by semi-automated identification of normal hematopoietic cells: A EuroFlow study.Cytometry B Clin Cytom. 2023 Sep 22. doi: 10.1002/cyto.b.22143. Online ahead of print. PMID: 37740440
6. Zaninelli S, Meli C, Borleri G, Quaroni M, Pavoni C, Gaipa G, Biondi A, Introna M, Golay J, Rambaldi A, Rambaldi B. Optimization and validation of in vivo flow cytometry chimeric antigen receptor T cell detection method using CD19his indirect staining.
Cytometry A. 2024 Feb;105(2):112-123. doi: 10.1002/cyto.a.24796. Epub 2023 Sep 27.
7. Zanier ER, Pischiutta F, Rulli E, Vargiolu A, Elli F, Gritti P, Gaipa G, Belotti D, Basso G, Zoerle T, Stocchetti N, Citerio G;MesenchymAlstromal cells for TraumaticbRainInjury (MATRIx): a study protocol for a multicenter, double-blind, randomised, placebo-controlledphase II trial.MATRIx Study group. Intensive Care Med Exp. 2023 Aug 25;11(1):56. doi: 10.1186/s40635-023-00535-1.
8. Alagna L, Palomba E, Chatenoud L, Massafra R, Magni F, Mancabelli L, Donnini S, Elli F, Forastieri A, Gaipa G, Abbruzzese C, Fumagalli R, Munari M, Panacea A, Picetti E, Terranova L, Turroni F, Vaschetto R, Zoerle T, Citerio G, Gori A, Bandera A. Comparison of multiple definitions for ventilator-associated pneumonia in patients requiringmechanicalventilation for non-pulmonaryconditions: preliminary data from PULMIVAP, an Italian multi-centre cohort study.J Hosp Infect. 2023 Oct; 140:90-95. doi: 10.1016/j.jhin.2023.07.023. Epub 2023 Aug 9.
9. Bugarin C, Antolini L, Buracchi C, Matarraz S, Coliva TA, Van der Velden VH, Szczepanski T, Da Costa ES, Van derSluijs A, Novakova M, Mejstrikova E, Nierkens S, De Mello FV, Fernandez P, Aanei C, Sędek Ł, Strocchio L, Masetti R, Sainati L, Philippé J, Valsecchi MG, Locatelli F, Van Dongen JJM, Biondi A, Orfao A, Gaipa G.Phenotypic profiling of CD34+ cells by advanced flow cytometryimprovesdiagnosis of juvenilemyelomonocyticleukemia.Haematologica. 2024 Feb 1;109(2):521-532. doi: 10.3324/haematol.2023.282805.
10. Capelli C, Cuofano C, Pavoni C, Frigerio S, Lisini D, Nava S, Quaroni M, Colombo V, Galli F, Bezukladova S, Panina-Bordignon P, Gaipa G, Comoli P, Cossu G, Martino G, Biondi A, Introna M, Golay J.Potencyassays and biomarkers for cell-basedadvanced therapy medicinal products.Front Immunol. 2023 Jun 9; 14:1186224. doi:10.3389/fimmu.2023.1186224. eCollection 2023.
11. 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.

12. 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.
13. 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.
14. 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. NatMed. 2023 Jan;29(1):75-85. doi: 10.1038/s41591-022-02097-3. Epub 2023 Jan 9. PMID: 36624312
15. 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: 36482893 Free PMC article.
16. 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.
17. 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.
18. 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.
19. 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.

Unità di Ricerca Dott.ssa Marta Serafini

A. Progetti di ricerca

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

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

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

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

2.1 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.I dati ottenuti 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.

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 i risultati in vivo sul modello che consentirà di valutarnel'efficaciasono in fase di ultimazione. Si prevede di sottomettere un articolo entro i prossimi mesi.

2.2 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. Si sta verificando di implementare questo studio testando questo asse chemochinico su CAR diretti contro molecole specifiche espresse sulla superficie delle cellule staminali leucemiche, i precursori delle cellule leucemiche circolanti contenuti nella nicchia midollare.

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

2.3 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. In collaborazione con il Prof. F. Dazzi (King's College, London, UK) stiamo sviluppando un modello in vivo per corroborare i dati che dimostrano la proprietà immunomodulatoria delle MSC verso le CAR-T.

3. Come la leucemia mieloide acuta modella la nicchia stromale midollare (Prof.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 articolo recentemente pubblicato dalla rivista Frontiers in Immunology.

4. Individuazione di nuovi assi chemochinici preferenzialmente espressi nella leucemia mieloide acuta (Prof.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. Nell'ambito di questo approccio sono stati identintificati alcuni assi che potrebbero essere di interesse e si stanno valutando i nuovi costrutti realizzati. L'obiettivo finale sarà valutare la capacità delle cellule CAR-T ingegnerizzate con assi chemochinici di raggiungere in maniera più spedita il midollo osseo dopo trattamento con farmaci chemioterapici e di persistere nella sede tumorale portando ad una maggiore specificità e efficacia.

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

5. 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 lavoro recentemente pubblicato sulla rivista Journal of Clinical Investigation Insight.

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. Un articolo che descrive i risultati raggiunti è attualmente sottomesso, in via di valutazione, ad una rivista scientifica.

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 Prof.ssa Marta Serafini (capo unità), dott.ssa Alice Pievani (ricercatrice), dott.ssa Marta Biondi (Post-Doc), dott.ssa Samantha Donsante (Post-Doc), dott.ssa Corinne Arsuffi (studentessa di dottorato DIMET), dott.ssa Carlotta Guzzetti (studentessa di dottorato DIMET), dott.ssa Mara Algeri (biotecnologa), dott.ssa Erica Grassenis (biotecnologa).

Pubblicazioni scientifiche del Centro Tettamanti (2023-24) - Serafini

1) 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.
2) 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 transmissionstagesinthebonemarrow. Front Cell Infect Microbiol. 2023 Apr 19;13:1161669. doi:10.3389/fcimb.2023.1161669.
3) 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. 2023 Hemasphere May 23;7(6):e896. doi: 10.1097/HS9.0000000000000896.
4) 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 May 25;141(21):2587-2598. doi: 10.1182/blood.2022018330.55)
5) 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. Front Immunol. 2023 May 25;14:1192333. doi: 10.3389/fimmu.2023.1192333
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. 2023Jun 27;7(12):2855-2871. doi: 10.1182/bloodadvances.2022008762.
7) Tomasoni C, Arsuffi C, Donsante S, Corsi A, Riminucci M, Biondi A, Pievani A, Serafini M. AML alters bone marrow stromal cell osteogenic commitment via Notch signaling. Front Immunol. 2023 Dec 4;14:1320497. doi: 10.3389/fimmu.2023.1320497.
8) Pievani A, Biondi M, Tettamanti S, Biondi A, Dotti G, Serafini M. CARs are sharpening their weapons. J Immunother Cancer 2024 Jan 31;12(1):e008275. doi: 10.1136/jitc-2023-008275.
9) Castiello MC, Brandas C, Ferrari S, Porcellini S, Sacchetti N, Canarutto D, Draghici E, Merelli I, Barcella M, Pelosi G, Vavassori V, Varesi A, Jacob A, Scala S, Basso-Ricci L, Paulis M, Strina D, Di Verniere M, Sergi Sergi L, Serafini M, Holland S, Bergerson JRE, De Ravin SS, Malech H, Pala P, Bosticardo M, Brombin C, Cugnata F, Calzoni E, Crooks G, Notarangelo L, Genovese P,

Naldini L, Villa A. Exonic knock-out/in gene editing in hematopoietic stem and progenitor cells rescues RAG1 immunodeficiency. Science Transl Med 2024 Feb 7; 16(733):eadh8162. doi: 10.1126/scitranslmed.adh8162.
10) Donsante S, Pievani A, Palmisano B, Finamore M, Fazio G, Corsi A, Biondi A, Tomatsu S, Piazza R, Serafini M*, Riminucci M*. Modeling skeletal dysplasia in Hurler syndrome using patient-derived bone marrow osteoprogenitor cells. JCI Insight 2024, Mar 8;9(5):e173449. Doi: 10.1172/jci.insight. 173449. *equal co-last
11) Crespiatico I, Zaghi M, Mastini C, D'Aliberti D, Mauri M, Mercado CM, Fontana D, Spinelli S, Crippa V, Inzoli E, Manghisi B, Civettini I, Ramazzotti D, Sangiorgio V, Brambilla V, Aroldi A, Banfi F, Barone C, Orsenigo R, Riera L, Riminucci M, Corsi A, Breccia M, Morotti A, Cilloni D, Roccaro A, Sacco A, Stagno F, Serafini M, Mottadelli F, Cazzaniga G, Pagni F, Chiarle R, Azzoni E, Sessa A, Gambacorti-Passerini C, Elli EM, Mologni L, Piazza R. First-hit SETBP1 mutations cause a myeloproliferative disorder with bone marrow fibrosis.Blood 2024 Apr 4;143(14):1399-1413. doi: 10.1182/blood.2023021349.
12) Alviano AM, Biondi M, Grassenis E, Biondi A, Serafini M* and Tettamanti S*.Fully Equipped CARs to Address Tumor Heterogeneity, Enhance Safety, and Improve the Functionality of Cellular Immunotherapies. Frontiers in Immunology 2024, in press.*equal co-last.

Unità di Ricerca Dott.ssa Giovanna D'Amico

A. Progetti di ricerca

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 nonché la chemioprotezione della leucemia, al fine di scoprire nuovi bersagli terapeutici. Un focus specifico è dato ad ActivinA, un modulatore chiave del mantenimento e dell'aggressività della leucemia e del ruolo del sistema immunitario nella attività pro-leucemia.
In particolare, il progetto dell'unità comprende sei linee di ricerca:

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

In particolare abbiamo scoperto che la linea leucemica 697 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. In conclusione, abbiamo dimostrato che ActA aumenta la produzione di vescicole ricche di miR-491-5p. 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). Paper under Revision, Scientific Report

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 del trasportatore di membrana di tale aminoacido (SNAT5) e di un'enzima (glutamina sintasi) fornendo un microambiente stromale favorevole per la sopravvivenza delle cellule leucemiche trattate con asparginasi. Studi futuri saranno necessari per bloccare questa via di protezione, mediante inibitori specifici. Aurino et al. Br J Haematol. 2024 Jan;204(1):292-305.

C) 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 con la percentuale di cellule leucemiche infiltranti il midollo. La somministrazione di una trappola molecolare per AttivinaA è stata in grado di prolungare significativamente la sopravvivenza dei topi leucemici, riducendo in maniera drastica l'infiltrato leucemico nel midollo ed in organi extramidollari quali la milza, dove la malattia è stata quasi completamente eradicata del 90%. Inoltre, abbiamo osservato che il 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, aumentata da 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. Studi di immunoistochimica hanno confermato quanto osservato in vivo.

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.

D) 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-CD19 colpiranno quindi direttamente la cellula leucemica e, con un secondo CAR, il macrofago pro-tumorale che non sarà più in grado di "proteggere" le cellule leucemiche che rimarranno eventualmente presenti.

E) Analisi di innovativi agonisti del TLR4 per la conversione dei macrofagi M2 ad attività pro-leucemica in macrofagi M1 ad attività anti-leucemico

La manipolazione della plasticità dei macrofagi (MΦ) mediante la riprogrammazione del fenotipo da M2 a M1 ha il potenziale di aumentare le funzioni antitumorali, inclusa l'uccisione diretta delle cellule tumorali e il miglioramento delle risposte immunitarie adattative. I recettori Toll-like (TLR) sono recettori di riconoscimento del pattern espressi nelle cellule immunitarie innate . Nei MΦ, gli agonisti di TLR inducono la polarizzazione M1, rendendoli composti ideali per riprogrammare i LAM. Nonostante i risultati promettenti, il loro uso clinico è stato limitato, poiché la somministrazione sistemica degli agonisti di TLR è gravata da tossicità. Indagheremo la possibilità di invertire i MΦ M2 in MΦ M1 anti-leucemia, utilizzando agonisti del TLR4 a base lipidica. Abbiamo già stabilito un metodo per generare MΦ derivati da monociti completamente differenziati con un profilo M2. Al giorno 6, sono stati aggiunti due diversi agonisti di TLR4, con DMSO come controllo del veicolo o con LPS come controllo positivo per ulteriori 24 ore. Le analisi di citometria a flusso hanno dimostrato che CD206 (Marker M2) è stato ridotto in modo dose-dipendente degli agonisti utilizzati in modo simile a LPS, suggerendo che entrambi gli agonisti di TLR4 sono in grado di invertire la polarizzazione dei MΦ di tipo M2. Ulteriori studi saranno fondamentali per comprendere se queste cellule acquisiscono un'attività anti-leucemica sia in vitro che in vivo.

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 le NALM-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 network tra i Centri di Eccellenza in Europa sulle malattie rare.

Le attività di ricerca si sono focalizzate su tre progetti:

A) caratterizzare il metabolismo delle 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 del 61% dell'attività del complessoIV . Inoltre, il rapporto ATP/AMP intracellulare è significativamente 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 metabolismo delle SDS-MSC.

Abbiamo stimolato le SDS MSC per 48h con 0.05% di dimentilsolfossido (DMSO), molecola che a basse concentrazioni 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 da un ripristino metabolico (n=6). Le SDS-MSC stimolate aumentano infatti il consumo di ossigeno e la sintesi di ATP in entrambe le vie mitocondriali, oltre che ripristinare l'attività del complesso IV. Inoltre, il DMSO riporta il rapporto ATP/AMP e l'attività della LDH al livello dei controlli e riduce significativamente lo stress ossidativo 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-MSC ripristinano il proprio difetto metabolico e recuperano il potenziale angiogenico in modo paragonabile al trattamento con il DMSO. In conclusione, abbiamo quindi dimostrato come l'alterato metabolismo potrebbe essere alla base del difetto angiogenico osservato nelle SDS-MSC. Inoltre, l'uso di antiossidanti è in grado di ripristinare il quadro 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 una staff scientist (Erica Dander), da 2 Post-Doc (Alessandra Fallati, Clarissa Gervason), 3 (PhD Students Rita Starace, Alice Giussani, Jennifer Romagnoli).

Pubblicazioni:

Asparagine transport through SLC1A5/ASCT2 and SLC38A5/SNAT5 is essential for BCP-ALL cell survival and a potential therapeutic target

Taurino G, Dander E, Chiu M, Pozzi G, Maccari C, Starace R, Silvestri D, Griffini E, Bianchi MG, Carubbi C, Andreoli R, Mirandola P, Valsecchi MG, Rizzari C, D'Amico G*, Bussolati O*. Br J Haematol. 2024 May 13. doi: 10.1111/bjh.19516. Online ahead of print. PMID: 38736325
*co-last name

Ataluren improves myelopoiesis and neutrophil chemotaxis by restoring ribosome biogenesis and reducing p53 levels in Shwachman-Diamond syndrome cells.
Cipolli M, Boni C, Penzo M, Villa I, Bolamperti S, Baldisseri E, Frattini A, Porta G, Api M, Selicato N, Roccia P, Pollutri D, Marinelli Busilacchi E, Poloni A, Caporelli N, D'Amico G, Pegoraro A, Cesaro S, Oyarbide U, Vella A, Lippi G, Corey SJ, Valli R, Polini A, Bezzerri V. Br J Haematol. 2024 Jan;204(1):292-305. doi: 10.1111/bjh.19134. Epub 2023 Oct 24.

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.

Monza,
L'Organo Amministrativo,

Il Presidente Dott. Luigi Roth

Il Direttore Scientifico Prof. Andrea Biondi