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

RELAZIONE DI GESTIONE SCIENTIFICA FONDAZIONE M. TETTAMANTI 2021-2022
Direttore Scientifico: Prof. Andrea Biondi

A. Progetti di ricerca

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

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

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

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

E' stato completato 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 (*lavoro in revisione*).

E' in corso uno screening esteso ed automatizzato di farmaci già in uso clinico per diverse patologie, per identificare potenziali molecole sulle quali estendere studi in vitro ed in vivo con lo scopo di introdurli nella pratica clinica in associazione a schemi ridotti di chemioterapia (*collaborazione con Prof. Borkhardt, Dusseldorf, Germania: abstract a Congresso AIEOP 2022*)

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

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

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

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

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

In una coorte di pazienti pediatrici di LAL-B ad alto rischio, tramite NGS abbiamo identificato11 traslocazioni di JAK2 con diversi partner, tra i quali PAX5 unico ricorrente. Scopo generale del progetto è quello di valutare l'efficacia della combinazione del trattamento TKI con agenti chemioterapici standard 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.

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

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

Scopo generale del progetto è studiare il ruolo di MSI2 in LAL infantMLLr sottotipo di leucemia ancora gravato da una prognosi molto sfavorevole. Questo avverrà nel contesto del prossimo protocollo Interfant-21, insieme ad altri studi biologici proposti (*finanziamentoigrantFight Kids Cancer*). 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.

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

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

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

Le cellule pre-leucemiche E/R mostrano una maggiore suscettibilità alla trasformazione a seguito di ulteriori insulti genetici, che innescano lo sviluppo di leucemia nell'1% dei casi E/R. Si ritiene che una risposta immunitaria e infiammatoria disregolate 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.

Stiamo utilizzando 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 concentreremo 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

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

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

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

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

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

Task 3.1Identificazioni di varianti germinali predisponenti a LAL

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

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

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

B.Board panel multidisciplinare di esperti.

Abbiamo costituito un panel di esperti (Genetista di laboratorio, Genetista clinico, Ematologi Pediatri, Tecnici di laboratorio) che discute le diverse richieste di analisi di casi con sospetto di alterazione genetica/predisposizione, decide la conduzione del caso, con eventuale indicazione alla consulenza genetica pre-test, la decisione sul test genetico da eseguire, la sua esecuzione, e la consulenza post-test. I primi contesti identificati sono le leucemie, le immunodeficienze e rare malattie ematologiche (vedi progetto 4).

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

Abbiamo analizzato 150 casi consecutivi di pazienti all'esordio di LAL pediatrica ed arruolati al protocollo AIEOP 2009 e 130 casi di ricadute, tramite un pannello NGS di 40 geni, selezionati dalla letteratura. E' in corso la valutazione dettagliata delle diverse varianti identificate. E' inoltre in corso il sequenziamento WES del DNA di remissione di malattia di 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 LAL ipodiploide è frequentemente associata a varianti di TP53, la maggior parte delle quali sono germline, suggerendo che la LAL ipodiploide possa essere una manifestazione della sindrome di Li-Fraumeni (LFS).Abbiamo eseguito l'analisi NGS di un pannello mirato di 40 geni, tra cui TP53, in una serie retrospettiva di pazienti italiani LAL ipodiploidi pediatrici arruolati in quattro protocolli di prima linea a livello nazionale. Abbiamo dimostrato l'elevata prevalenza di varianti germinali di TP53 nella LLA ipodiploide, confermando così che la LLA ipodiploide è una possibile manifestazione della LFS. Questa evidenza evidenzia l'importanza della consulenza genetica e dello screening TP53 per i pazienti e le famiglie ipodiploidi p53.

Sono in corso uno studio sui pazienti trapiantati (*collaborazione EBMT pediatric*), per identificare l'insorgenza di secondi tumori e capire l'incidenza dei diversi regimi di condizionamento, 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

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

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

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

Abbiamo contribuito alla caratterizzazione di tre nuovi pazienti, da famiglie non imparentate, con agammaglobulinemia, infezioni ricorrenti e cardiomiopatia ipertrofica. Due di loro presentavano anche neutropenia cronica intermittente o grave. Abbiamo identificato varianti omozigoti o eterozigoti composte nel gene *Folliculininteractingprotein 1*(FNIP1), con conseguente perdita della proteina. Il metabolismo delle cellule B, inclusi i numeri e l'attività mitocondriale e la via PI3K / AKT, ne risultava compromessa (*Saettini F, et al. Blood. 2021;137:493-499*)

In un paziente con Familial hemophagocytic lymphohistiocytosis di tipo 2 (FHL2) è stata identificata la variante p.K285Sfs 4 in omozigozi, associata ad esito molto precoce e fatale. Tale variante causa l'arresto prematuro della proteina perforina (PRF1), responsabile del difetto presinaptico. La FHL è una malattia della prima infanzia e l'effetto delle varianti sulla struttura proteica è correlato all'esordio precoce della malattia. L'ampio spettro fenotipico di FHL2 nell'uomo indica la necessità cruciale di testare la patogenicità di ogni nuova variante PRF1 individuata (Saettini F, et al. PediatrHematolOncol. 2021;38:174-178).

Abbiamo identificato ed esplorato il diverso significato di variant identiche di EP300 in Rubinstein-Taybisyndrome con diverso fenotipo clinico ed immunologico (Saettini F, et al. Am J MedGenet A. 2022;188:2129-2134).

L'Unità di Genetica della Leucemia Pediatrica, diretta dal Dr.Cazzaniga è composta da 3 Post Doc (M.Bardini, G.Fazio, C.Palmi), 5PhDstudent (L.Bettini, M.Bertagna, M.Quadri, L.Valsecchi, D.Acunzo), 1 PhDstudent Marie Curie Program (A.Oikonomou), 1 assegnista di ricerca, Pediatra, Ematologa (M.D'Angiò), 1 Pediatra (F. Guerra, 2021), 2 studenti di Biotecnologie mediche. Si avvale inoltre del supporto di personale prevalentemente dedicato alla diagnostica molecolare e citogenetica (tecnici di laboratorio e biotecnologi).

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

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

Task 1: Ruolo potenziale di ActivinA sulla vescicolazione cellulare di BCP-ALL, in termini di concentrazione e contenuto delle vescicole extracellulari (EV) di acidi nucleici e proteine. In particolare abbiamo scoperto che la linea leucemica 697 sono in grado di produrre entrambe le popolazioni di EV, ma l'aggiunta di Activin A aumenta significativamente il rilascio di vescicole. In modo particolare due miRNA vengono regolati dalla sua azione, questi miRNA sono molto importanti per indurre la migrazione cellulare e la chemioresistenza. Stiamo ora eseguendo esperimenti di modulazione della loro espressione *in vitro*, per comprendere la loro potenziale attività nella nicchia leucemica.

Task 2 Ruolo diActivinA di promuovere l'ingresso delle cellule leucemiche nel CNS, in modelli in vitro ed in vivo delle cellule leucemiche stimolate con ActivinA*e di alterare il microambiente cerebrale* utilizzando co-culture di fettine organotipiche con le cellule leucemiche (*in collaborazione con la Dott.ssa Zanier, Istituto Mario Negri*). I nostri risultati hanno mostrato che le le cellule leucemiche pre-trattate con AttivinaA inducono una aumentata mortalità cellulare del tessuto cerebrale. Inoltre, abbiamo osservato che le tali cellule ,rispetto alle cellule cotrollo e alle cellule non trattate, inducono una significativa attivazione delle cellule microgliali, suggerendo una riduzione dell'attività fagocitica. Tali modifiche si associano a cambiamenti significativi di espressione genica, caratterizzati da una down-regolazione dei geni pro-infiammatori e un'up-regolazione dei geni anti-infiammatori. Tali dati mostrano come il pretrattamento con AttivinaA potenzi la capacità delle cellule leucemiche di corrompere il microambiente cerebrale a supporto del tumore stesso.

*Task 3 Cambiamenti metabolici all'interno della nicchia leucemica.*I meccanismi alla base della protezione metabolica delle cellule leucemiche da parte delle cellule mesenchimali stromali (MSC) vengono analizzati mediante lo studio dei geni coinvolti nella sintesi e nel trasporto della glutammina e dell'asparagina, l'identificazione delle vie metaboliche proleucemiche, mediante un approccio metabolomico e di caratterizzazione degli effetti di ActivinA sul metabolismo delle MSC e delle cellule leucemiche. In particolare (*in collaborazione con il Prof. O. Bussolati ,Università di Parma*), abbiamo dimostrato che Le MSC del midollo osseo secernono l'asparagina (Asn) e proteggono la cellula leucemica di BCP-ALL dal trattamento con L-asparaginasi (ASNase).

Task 4 Ruolo dell'Activina A nella chemio-resistenza. Abbiamo utilizzato l'Asparaginasi e il desametasone, che sono farmaci antileucemici utilizzati negli attuali protocolli di BCP-ALL. In primo luogo, abbiamo eseguito test di chemioresistenza sulle cellule per valutare l'effetto dell'ActivinA e abbiamo dimostrato che la molecola è in grado di diminuire la sensibilità delle cellule leucemiche all'apoptosi indotta dai farmaci. Abbiamo dimostrato medianti saggi *in vitro* che tale fenomeno è dovuto ad una modulazione dei fattori anti-apoptotici, nonché una riduzione dei radicali dell'Ossigeno. Questo effetto rende la cellula leucemica trattata con ActivinA resistente alla chemioterapia

*Task 5 Combinare le terapie anti-antileucemiche con il targeting del microambiente, utilizzando un farmaco "trappola" di ActivinA.*A tal fine utilizzeremo l'ortologo murino (RAP-011) del farmaco Sotatercept, che oggi viene utilizzato in clinica per il trattamento di diverse malattie non oncologiche. Abbiamo sottoscritto un accordo con la multinazionale Celgene (USA) per utilizzare RAP-011 nel contesto della terapia anti-leucemia, come unico centro al mondo. Abbiamo svolto esperimenti *in vitro* per testare l'attività del RAP-011 sulla leucemia ed abbiamo dimostrato sorprendentemente che solo questo farmaco, in assenza di chemioterapici, è in grado di ridurre drasticamente l'attecchimento della leucemia. Ora stiamo studiando se la combinazione con l'Asparginasi incrementa la mortalità della cellula leucemica. Successivamente testeremo la combinazione del RAP-011 di eradicare la BCP-ALL sarà testata *in vitro* ed *in vivo* in combinazione con le cellule CARCIK-CD19, attualmente utilizzate nel nostro centro.

Task 6. Studio della componente macrofagicapro-tumorale nella nicchia leucemica. La BCP-ALL riprogramma lo stroma del midollo osseo circostante (BM) per creare nicchie di supporto alla leucemia. Per chiarire il contributo delle cellule immunitarie al microambiente leucemico, ci proponiamo di studiare il coinvolgimento dei compartimenti del monocito e del macrofago nella patologia del BCP-ALL. Le analisi immunoistochimiche hanno mostrato che i macrofagi CD68-positivi sono notevolmente aumentati nelle biopsie del BM di pazienti leucemici, rispetto ai controlli. Molto importante, tali cellule esprimono prevalentemente i marcatori dei macrofagi M2 pro-tumorali, CD163 e CD206. Inoltre, è stata osservata una polarizzazione sbilanciata dei monociti nel sangue periferico dei pazienti BCP-ALL, dove è stato osservato un aumento significativo di monociti "non classici" e "intermedi", che esprimono alti livelli di CD163 (*in collaborazione con il gruppo del Prof. Mantovani- HumanitasUniversity, Milano*). Attualmente stiamo costruendo un recettore chimerico che riconosca in modo molto specifico i macrofadi M2. Tale CAR sarà in grado di ucciderli e, nello stesso tempo, di redizionare la loro funzione a macrofagi anti-tumorali.

6. Studio dell'asse Chemerina/Chem R23 in vivo in un modello murino di GVHD acuta.

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

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

patogenesi della GVHD. I risultati ottenuti sono di estremo interesse, infatti mostrano che i topi trapiantati con cellule ottenute da topi KO sviluppano una malattia significativamente più severa rispetto a topi trapiantati con cellule ottenute da topi wild type. Inoltre l'analisi citofluorimetrica dell'infiltrato leucocitario ha mostrato un aumento del numero di neutrofili nel colon di topi tChemR23$^{-/-}$ rispetto ai topi tWT. Tale aumento è associato ad una significativa riduzione dell'infiltrato macrofagico nei tChemR23$^{-/-}$. Abbiamo dimostrato che la presenza dei macorofagi ChemR23 è in grado di indurre meno infiammazione, meno danno epiteliale ed indurre la rigenerazione intestinale.

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

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

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

Le attività di ricerca si sono focalizzate su due progetti:

A. Caratterizzazione del difetto funzionale e molecolare delle cellule mesenchimali nei pazienti con SDS (SDS-MSC) che non sono in grado di ricreare una nicchia ematopoietica normale, con proprietà angiogeniche compromesse in risposta a stimoli angiogenici suggerendo che tale difetto potrebbe svolgere un ruolo fondamentale nel difetto vascolare, e nella neutropenia dei pazienti affetti da SDS. Abbiamo dimostrato che il dopo trattamento con basse dosi di un anti-ossidante (DMSO) le SDS-MSC recuperano la capacità di formare tubuli in modo paragonabile alle MSC controllo. Importante, le SDS-MSCs mostrano un'alta perossidazione lipidica rispetto alle HD-MSCs ed il DMSO la riduce drasticamente riportandola a valori comparabili alle HD-MSC. Analizzando la catena respiratoria mitocondriale, sorprendentemente, l'utilizzo del DMSO riporta la funzionalità metabolica ad un livello del tutto paragonabile alle HD-MSC, indicando come l'alterato stato energetico delle SDS-MSC sia alla base del loro difetto angiogenico e che l'uso di anti-ossidanti possa aprire la strada a nuovi trattamenti terapeutici per i pazienti SDS.
B. Analisi in vitro delle proprietà di un farmaco grado di "saltare" le mutazioni stop codon che sono presenti nella maggior parte dei pazienti SDS ed inducono la formazione della proteina non funzionante (*in collaborazione con il Dr. M. Cipolli dell'Università di Ancona*)

   In studi su linee ematopoietiche e non ematopoietiche (MNC da midollo osseo, linee linfocitarie immortalizzate e cellule mesenchimali stromali) la proteina viene prodotta nella forma integra e in un saggio funzionale di produzione in vitro delle colonie di precursori emopoietici (G-CFU) risulta funzionale. Attualmente è in esame al ministero un protocollo clinico che prevede l'utilizzo di tale molecola nei pazienti SDS.

L'Unità della Dr.ssa D'Amico è costituita da una Post-doc (Erica Dander), da 6PhDStudent (Alessandra Fallati, Noemi di Marzo, Clarissa Gervasoni, Eugenia Licari, Rita Starace, Alice Giussani).

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

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

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

Nel 2015, anno in cui ci siamo proposti di portare in sperimentazione clinica un prodotto interamente sviluppato dalla FT(CARCIKCD19) di cui è stato depositato un brevetto e attualmente attivo, inizia la collaborazione con Formula, azienda Biotech con sede in USA, con la quale mediante un Research Sponsored Agreement (RSA) otteniamo i finanziamenti per lo sviluppo clinico del prodotto CARCIKCD19. Il prodotto era originale per diversi aspetti rispetto a quello che successivamente (2018) ha ottenuto l'approvazione da parte di EMA ed FDA. Ma è stata certamente la conferma dei risultati dello studio di Fase ½ avvenuta in queste settimane (Ottobre, 2020) che si è avuta conferma di tale originalità.

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

Attualmente sono diversi i progetti che prevedono ricerca e sviluppo (preclinico e clinico) nelle diverse Unità di Ricerca della FT, in particolare quelle della Dr.sa Serafini (in cui si è collocata come project

leader la Dr.ssa Tettamanti S.) e del Dr. Gaipa G.. Ma anche nell'Unità della Dr.ssa G.D'Amico, una nuova recentissima linea di ricerca prevede proprio l'utilizzo dei CARCIKCD19 e molecole che interferiscono con target del microambiente midollare. Al fine di rendere più integrato lo sforzo delle diverse Unità di Ricerca, il Prof. Biondi si è assunto l'incarico di un coordinamento dei diversi progetti sui CART, che consente altresì di sviluppare al meglio il rapporto di R&D con CoImmune.

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

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

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

9.2 Sviluppo di un 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 nostra unità sta sviluppando cellule CAR "bi-specifiche", che vadano a colpire con efficacia le cellule staminali leucemiche che co-esprimono gli antigeni CD123 e CD33, ma evitando l'effetto tossico, definito "off-target", su tessuti normali, come cellule staminali ematopoietiche e cellule endoteliali sane.

Sempre nella ricerca di un antigene bersaglio ideale per l'AML, la proteina TIM-3 è emersa come un nuovo attraente bersaglio selettivo delle cellule staminali leucemiche (LSC) promuovendone la sopravvivenza. Inoltre, essendo un inibitore di checkpoint immunitario, è stato scoperto che promuove l'esaurimento delle cellule T e l'espansione delle cellule soppressorie di derivazione mieloide e la differenziazione nei macrofagi associati al tumore. Queste caratteristiche suggeriscono che si potrebbe ottenere un duplice effetto bersagliando la proteina TIM-3: si colpirebbero, infatti, le LSC e, allo stesso tempo, si modulerebbe il microambiente tumorale immunosoppressivo. Considerando queste premesse, 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 in fase di valutazione e offrirà l'opportunità di studiare tramite approcci in vitro/in vivo la sua efficacia terapeutica.

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

Nuovi studi hanno identificato una serie di fattori, coinvolti nell'interazione tra la nicchia e le cellule leucemiche, che potrebbero essere bersagliati o sfruttati a nostro vantaggio per lo sviluppo di nuovi approcci terapeutici. Tra questi, l'asse chemochinico CXCL12-CXCR4 sembra essere di particolare interesse nella LMA. Il nostro gruppo di ricerca ha formulato l'idea di sfruttare l'asse chemochinico CXCL12-CXCR4 per migliorare le capacità migratorie delle cellule CAR all'interno del midollo e favorire l'eradicazione della leucemia. Nello specifico, abbiamo disegnato un costrutto bicistronico composto sia da un CAR diretto contro la molecola CD33, un antigene espresso dalla maggior parte dei blasti LMA, sia dal recettore CXCR4. In sostanza, ipotizziamo che mimando lo stesso meccanismo adoperato dai blasti, le cellule CIK che over-esprimono CXCR4, possano migliorare la loro capacità migratoria nel midollo osseo, rendendo così anche più efficace e mirata la loro azione anti-leucemica. Allo scopo di migliorare ulteriormente la capacità di infiltrazione delle cellule CAR-CIK nella nicchia, stiamo valutando anche una mutazione del recettore CXCR4 associata ad un guadagno di funzione ($CXCR4^{R334X}$), descritta nella sindrome di WHIM e associata con una superiore capacità di ritenzione dei leucociti all'interno del midollo osseo. 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. Stiamo concludendo la stesura di un lavoro che descriverà come armare le cellule CAR-T con un recettore chemochinico può rappresentare una strategia promettente per l'aumento del loro potenziale terapeutico per la LMA.

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

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

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

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

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

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

Recenti studi suggeriscono che la leucemia mieloide acuta (LMA) possa trasformare la nicchia midollare in un microambiente permissivo per la leucemia e sfavorevole per la normale emopoiesi. L'influenza della LMA sul differenziamento delle cellule osteogeniche e sull'architettura del tessuto osseo è stata già documentata in modelli murini. Tuttavia si sa poco sulle modifiche indotte dalla LMA sulle cellule staminali mesenchimali umane derivate dal midollo osseo di pazienti affetti da questa patologia. Con il fine di capire questo meccanismo, Il nostro gruppo ha studiato la presenza di alterazioni intrinseche nel potenziale differenziativo delle cellule staminali mesenchimali di pazienti con LMA utilizzando due sistemi in vivo specifici per valutarne il potenziale osteogenico e la capacità di generare una nicchia stromale completa. I progenitori stromali midollari di pazienti pediatrici con LMA, mostrano un pattern di differenziazione intrinsecamente anomalo anche quando vengono rimossi dalla loro nicchia patologica. Tutte queste alterazioni possono contribuire all'inibizione della crescita delle normali cellule staminali ematopoietiche favorendo, invece, la sopravvivenza e l'espansione selettiva dei blasti. Conseguentemente, stiamo investigando il possibile coinvolgimento del 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-specificAlkaline Phosphatase (TNAP), marcatore dell'osteogenesi precoce, e la riduzione di espressione di osteocalcina (BGLAP) e osteopontina (SPP1), marcatori dell'osteogenesi tardiva. Nel complesso, i nostri risultati sembrano suggerire che il Notchsignalling viene attivato dalle cellule di LAM 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 potranno portare all'identificazione di nuovi bersagli per terapie mirate al microambiente nei pazienti affetti da LMA.

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

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

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

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

La mucopolissacaridosi di tipo I (MPSI) 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 e, possibilmente, identificare nuovi bersagli terapeutici per il trattamento dei pazienti MPS-IH.
Inoltre, i nostri studi forniranno una prova di principio per l'uso dell'approccio proposto basato su MSC per studiare altre malattie scheletriche genetiche rare che coinvolgono la piastra di crescita.
Nonostante l'efficacia del trapianto di cellule staminali ematopoietiche (HSCT) e della terapia enzimatica sostitutiva (ERT) nella correzione delle manifestazioni cliniche legate agli organi viscerali, il completo miglioramento dei difetti muscoloscheletrici e neurocognitivi rimane ancora una sfida in quanto impatta la qualità della vita dei pazienti. Il progetto, 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 migliorare le manifestazioni cliniche negli organi

solitamente refrattari al trattamento corrente. Abbiamo potuto apprezzare un ridotto accumulo viscerale di GAGs. A livello scheletrico il trattamento ha determinato un significativo miglioramento a livello radiografico e istologico con evidenza di normalizzazione dei parametri morfometrici sia metafisari che corticali. Inoltre, l'efficacia terapeutica a livello del sistema nervoso centrale è stata dimostrata dalla diminuzione della neuroinfiammazione e delle anomalie metaboliche neuronali. Poiché attualmente ci sono opzioni terapeutiche limitate per i pazienti con MPS-I, i nostri risultati potranno fornire un ulteriore passo avanti nel trattamento di questa malattia rara.

Questo progetto è svolto in collaborazione con la Prof.ssa Riminucci M (*Dipartimento di Anatomia Patologica, Policlinico Umberto I, Universita' La Sapienza, Roma*), con il Professor ShunjiTomatsu (*Hospital for Children di Willmington, DE, USA*) e con il Prof. Aiuti A (*Tiget, Ospedale San Raffaele, Milano*).

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

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

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

La terapia con cellule CAR rappresenta una nuova frontiera terapeutica nell'ambito della leucemia acuta linfoblastica a precursori B (LLA-B). Abbiamo recentemente dimostrato l'efficacia pre-clinica di cellule Cytokine Induced Killer (CIK) allogeniche e trasfettate con il trasposone CD19CAR (CARCIK-CD19) in un sistema Sleeping Beauty [1]. Le cellule CARCIK-CD19 hanno dimostrato una efficace attività antitumorale in modelli murini immunodeficienti trapiantati con cellule di LLA-B [2]. Sulla base di questi dati e è stato recentemente concluso uno studio di fase I/II (EudraCT 2017-000900-38, ClinicalTrials. Gov ID NCT03389035) . Questo studio Ha dimostrato che le cellule CARCIK-CD19 sono state prodotte con successo per tutti i pazienti a partire da soli 50 mL di sangue periferico donatore di trapianto. Nella maggior parte dei pazienti è stata raggiunta una robusta espansione in vivo e le cellule CAR sono risultate misurabili fino a 2 anni dal trattamento. L'infusione di CARCIK-CD19 è risultata notevolmente sicura in tutti i pazienti trattati, con il 28% di Citokine Relese syndrome (CRS) di grado 1-2, nessuna GVHD e il 10% di complicanze neurologiche di grado 3. Ai livelli di dose somministrata più alti (>7,5 x 10^6 cellule CAR/Kg), è stato raggiunto un tasso di risposta del 73%, indipendentemente dal tipo di donatore. La sopravvivenza totale dei pazienti trattati con le dosi più alte è stata del 73% a 6 mesi. Sebbene l'antigene CD19 sia espresso essenzialmente in tutti i casi di LLA-B alla diagnosi [4,5], le recidive con perdita o ridotta espressione sulla superficie cellulare del CD19 sono sempre più riconosciute come causa di fallimento del trattamento [6-9]. I dati del nostro laboratorio hanno dimostrato il ruolo della via BAFF/BAFF-Receptor (BAFF-R) nel supportare la sopravvivenza delle cellule B-ALL e nel contribuire alla resistenza del clone leucemico alla terapia nel microambiente BM [10]. In particolare, abbiamo dimostrato che BAFF-R è altamente espresso sui campioni diagnostici LLA-B e viene preservato durante il trattamento farmacologico e in caso di recidiva. Questi risultati hanno portato alla progettazione di una strategia per le cellule CAR T mirata a BAFF-R [11] e alla

sua combinazione con l'approccio anti-CD19, dimostrando un'attività superiore anche nei confronti della leucemia recidivante B-ALL CD19-negativa. Per valutare la sicurezza e l'efficacia del targeting BAFFR, i livelli di espressione di BAFF-R sono statimisurati in campioni di tessuto sano e in campioni di B-LLA, sia alla diagnosi che in recidiva. Per costruire il CAR anti-BAFF-R:

a) Abbiamo ottenuto la single chain fragment variable (scFv) di un anticorpo anti-BAFF-R (clone HuBR9.1) sequenziando gli ibridomi che producono l'anticorpo stesso.

b) Le sequenze scFv di anti-BAFF-R sono state clonate in frame con i domini di trasduzione del segnale CD28-OX40-CD3zeta nel vettore SB per generare cellule CARCIK-BAFF-R.

c) Abbiamo deciso di generare sei CARs anti-BAFFR che esplorano diversi orientamenti delle scFv e diverse lunghezze dello spacer (denominati BAFFR.CAR e INV.CAR per gli orientamenti canonici VL-VH e VH-VL invertiti, rispettivamente). Il troncamento dello spacer ha fortemente compromesso l'espressione del CAR e le funzioni di effettori. Tra tutti i costrutti, solo BAFFR.CAR, INV.CAR e INVsh. CAR sono stati espressi in modo stabile. Le varianti brevi hanno esercitato la massima attività citotossica verso la linea leucemica NALM-6. L'attività antitumorale delle cellule di CARCIK-BAFF-R è stata valutata verso diverse linee cellulari B-ALL e in campioni B-ALL primari, in confronto e in combinazione con l'approccio CD19CAR. Il trattamento simultaneo con cellule T CD19.CAR e INVsh.CAR ha portato a una citotossicità statisticamente significativa superiore verso i blasti di B-ALL. Abbiamo inoltre utilizzato un campione derivato da un paziente trattato con Blinatumomab in seguito alla comparsa di recidive caratterizzate da perdita di epitopo. La combinazione CARs è stata in grado di esercitare un'attività antitumorale verso la leucemia CD19-negativa. Visto l'espressione eterogenea del target BAFF-R in pazienti B-ALL, abbiamo focalizzato il nostro interesse sulla combinazione CD22 e BAFF-R, entrambi espressi sia sui linfociti B normali che nelle neoplasie a cellule B. È interessante notare che, come dimostrato da studi precedenti, la loro espressione persiste sulle cellule B leucemiche anche quando l'espressione del CD19 è down-regolata. L'obbiettivo è stato quindi quello di sviluppare recettori chimerici anti-CD22 e anti-BAFFR da combinare con i CAR anti-CD19 già utilizzati in clinica come possibile strategia multi-target. Abbiamo costruito nuovi CAR anti-CD22 e anti-BAFFR e abbiamo clonato gli inserti ottenuti come trasposoni in un plasmide di espressione SB pT4 usando come costimolazione 41BB. Abbiamo generato cellule CIK partendo da PBMC di donatori sani attraverso elettroporazione in presenza del vettore SB e successiva differenziazione a CIK. Per ogni coltura abbiamo analizzato l'espansione delle cellule e il loro aumento. Al giorno +7, +14 e +21 abbiamo valutato l'espressione di CAR, la sottopopolazione di cellule T e il profilo di esaurimento del nostro prodotto cellulare mediante citometria a flusso. Per valutare la capacità di uccisione delle cellule CIK non modificate e di quelle reindirizzate da CAR, sono stati eseguiti saggi citotossici. In questi saggi le cellule CIK sono state co-coltivate per 4 ore o per tutta la notte con bersagli (NALM-6, DAUDI, RAJI), precedentemente marcati con CFSE, in un rapporto effettore:bersaglio (E:T) di 5:1. Per valutare la qualità e la sicurezza dei nostri prodotti CARCIK, abbiamo valutato il numero di copie del vettore (VCN). Gli sforzi futuri saranno dedicati alla validazione della strategia multi-target in vivo.

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

Al fine di una migliore comprensione dei fattori biologici determinanti l'efficacia e la durata dell'azione dei linfociti CAR T in vivo abbiamo ipotizzato che vi possano essere differenze rilevanti nel trascrittoma delle cellule CAR T che persistono a lungo termine rispetto a quello dei linfociti CAR T che perdono la loro

capacità di espansione e durata. A questo scopo utilizzeremo una tecnica di Single-cell RNA sequencing per indagare il microambiente midollare, la componente della malattia residua e le cellule CAR T. Gli esperimenti saranno condotti in collaborazione con il Prof. M. Pagani (IFOM, Milano). Saranno utilizzati campioni ricavati da pazienti trattati con cellule CARCIK-CD19 o trattati con cellule CAR T commerciali. E' in corso la costruzione di una libreria di scRNAseq [Chromium Single Cell 5-library and V(D)J enrichment kit (10× Genomics)]. I dati attualmente ottenuti hanno dimostrato la fattibilità della procedura di sorting delle popolazioni in termini di purezza e vitalità. Abbiamo analizzato più di 10 campioni raccolti da pazienti trattati con cellule CAR-T a diversi time points e con diversi gradi di risposta alla terapia sui quali indagheremo i parametri biologici sopra descritti. Risultati in sintesi:

1) Sei diversi gruppi di cellule immunitarie CD45 + CD3- sono stati identificati nel midollo osseo dei pazienti trattati con cellule CAR attraverso un'identificazione del tipo cellulare basata su marcatori di immunofenotipo.
2) Il trattamento CAR T genera un rimodellamento del microambiente immunitario, in particolare l'analisi si osserva un aumento dei compartimenti mieloide e natural killer dopo la infusione delle cellule CAR. Il compartimento mieloide è significativamente arricchito di vie associate alla risposta all'Interferone e all'Ipossia suggerendo una attivazione del segnale infiammatorio seguita dalla modulazione della risposta attraverso l'attivazione di vie inibitorie e la presenza di Cellule Soppressorie di derivazione mieloide
3) Sono state identificate diverse popolazioni di cellule T ed in esse è stato osservato un aumento della memoria precoce e dei markers di esaurimento. Inoltre, siamo stati in grado di identificare le cellule CAR T. Il compartimento CAR T è significativamente arricchito nelle vie associate alla risposta all'interferone e alla segnalazione del TGFb.
4) La validazione di questi risultati si baserà sull'espansione della coorte di pazienti attraverso l'inclusione di campioni da altri centri, analisi del flusso ed esperimenti in vitro e in vivo

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

Nell'ambito della nostra collaborazione con il consorzio europeo EUROFLOW (*in collaborazione con il Prof. Alberto Orfao, Salamanca*) sono stati sviluppati pannelli di anticorpi specifici per la caratterizzazione immunologica e funzionale di tutte le popolazioni cellulari misurabili durante il follow-up dei pazienti trattati con cellule CAR-T. In questo contesto abbiamo intrapreso uno studio di monitoraggio immunologico longitudinale del dei pazienti trattati con cellule CARCIK-CD19 prima e dopo la somministrazione. Abbiamo studiato 27 pazienti con LLA-B recidivante/refrattaria (r/r) dopo trapianto allogenico di midollo osseo. I campioni di sangue periferico o midollo osseo sono stati raccolti in diversi time-points dall'infusione e sono stati analizzati per quantificare la malattia minima residua (MRD), la quantità, la cinetica, la persistenza e l'immunofenotipo delle cellule CAR. Abbiamo voluto valutare l'impatto di diversi parametri immunologici sugli endpoint clinici (sopravvivenza, risposta alla terapia). Abbiamo inoltre studiato il ruolo del residuo tumorale prima dell'infusione. In questo studio abbiamo dimostrato che il carico tumorale dopo la linfodeplezione è associato alla sopravvivenza globale (OS) del paziente, alla remissione completa al giorno 28 dall'infusione e allo stato di sopravvivenza a 6 mesi dopo l'infusione. I livelli di MRD al giorno 28 sono significativamente correlati con la OS, dimostrando tale parametro ha un forte valore predittivo. I nostri dati dimostrano anche che la persistenza delle cellule CAR-T in momenti successivi rispetto al giorno 28 è un fattore predittivo rilevante per la durata della risposta alla terapia. Infine, l'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.

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

14.1 *Caratterizzazione immunofenotipica della JMML*

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

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

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

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

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

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

La tecnica di citometria di massa (CyTOF) consente la misurazione di oltre 40 parametri per singola cellula, rendendo questo approccio un metodo ideale per indagare la complessa biologia di T-ALL e per testare farmaci candidati per il targeting cellulare. Abbiamo caratterizzato campioni T-ALL pediatrici dimostrando la fattibilità del profilo cellulare di segnale basato su CyTOF delle vie principali di trasduzione del segnale. Abbiamo individuato pathways attivi nei blasti di T-ALL rispetto ai linfociti residui e abbiamo identificato cluster distinti di pazienti con risposta a IL-7 e inibitori del pathway PI3K/AkT/mTOR che suggeriscono mutua esclusività tra alterazioni genomiche del percorso JAK-STAT (o Ras) e alterazioni del percorso PI3K-AKT. Questi risultati sono stati pubblicati nel 2022 sottoforma di articolo sulla rivista scientifica Haematologica.

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

Valutazione di un clone di anti-CD43 (UN-1) mediante test *in vitro* su linee leucemiche di T-ALL e su cellule primarie: Obiettivo è stato quello di stabilire la specificità e la efficienza di legame del clone UN-1 alle cellule T-ALL. Inoltre abbiamo studiato *in vitro* l'effetto sul segnale intracellulare sulla proliferazione, l'apoptosi ed il ciclo cellulare, in collaborazione con l'Università di Catanzaro (*Prof. PierFrancesco Tassone*). L'espressione dell'antigene è stata valutata in Immunoistochimica e mediante citometria a flusso su sangue sano periferico e su midollo osseo in cellule di T-ALL sia primarie che di linee leucemiche immortalizzate. E' stata dimostrata la positività dell'antigene target nel 48,1% dei campioni primari testati, mentre è risultato negativo in tutti i tessuti normali. L'anticorpo ha dimostrato una notevole capacità di *killing* in vitro anticorpo-mediata. Inoltre anche gli esperimenti in vivo hanno dimostrato una significativa efficacia nei confronti della malattia in modelli murini di malattia refrattaria. Questi dati sono stati pubblicati nel 2021 sulla rivista scientifica Journal for Immunotherapy of Cancer.

*L'Unità diretta dal Dr. G. Gaipa è costituita dalla Dr.ssa Buracchi C.**,** Biologa, PhD – Ricercatrice post-doc, Dr.ssa Bugarin C. Biologa, Assistente di Ricerca; Dr.ssa Giusi Melita G., Biotecnologa, Assistente di Ricerca**,** Dr.ssa Ponzo M., PhD student**,** Dr. Alex Moretti, PhD student (da Novembre 2020); Dr. Quaroni M. Biotecnologo, borsista Assistente di Ricerca, Dr. Simone Naso borsista Assistente di Ricerca. Inoltre è attiva una collaborazione con la Dr.ssa Chiara Francesca Magnani , assistant professor presso il Children Hospital di Zurigo (CH).*

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

L'arruolamento a studi clinici controllati costituisce la modalità ottimale per garantire il trattamento ad ogni bambino e rappresenta uno dei motivi del successo nella cura delle leucemie e linfomi pediatrici. L'organizzazione di uno studio di ricerca clinica richiede risorse aggiuntive in termini di organizzazione, gestione ed esecuzioni di indagini di laboratorio, non tutti riconosciuti dai costi di assistenza del servizio sanitario nazionale.
La Clinica Pediatrica di Monza è coordinatrice dal 1988 dei protocolli dell'AIEOP per la LAL (che dal 2000 sono realizzati congiuntamente ai gruppi cooperativi di Germania ed Austria), dal 2003 per le ricadute LAL; inoltre gestisce i protocolli internazionali per i sottogruppi di LAL del bambino di età inferiore LAL'anno (Interfant), e per la LALPh+ (EsPhALL). Complessivamente in termini di attività, presso le unità di Biologia Molecola re e di Citogenetica del Centro Ricerca Tettamanti di Monza vengono riferiti il materiale per le analisi ed i dati dei 400 bambini ed adolescenti affetti da leucemia acuta linfoblastica in Italia e oltre il 10% direttamente per le cure.

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

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

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

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

Nello specifico:

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

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

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

Le persone coinvolte nell'attività diagnostica sono complessivamente 17: 3 nel Settore Morfologia/Immunofenotipo, 11 nel Settore Biologia Molecolare, 3 nel Settore Citogenetica. Nonostante il Laboratorio di Diagnostica Emato-Oncologica M.Tettamanti faccia capo alla Fondazione MBBM, il personale dedica una parte della propria professionalità e tempo a progetti di ricerca clinica di FT.

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

C. Attività di Formazione

Prosegue l'attività di formazione di studenti dei programmi di Dottorato dell'Università di Milano-Bicocca nell'ambito del "PhD Program in Translational Medicine" (DIMET).

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

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

E. Pubblicazioni scientifiche del Centro Tettamanti (2021-22)

Cazzaniga:

1. **Cazzaniga G**, Songia S, Biondi A; EuroMRD Working Group. PCR Technology to Identify Minimal Residual Disease.MethodsMol Biol. 2021;2185:77-94.
2. Schwab CJ, Roberts KG, Boer JM, Gohring G, Steinemann D, Vora A, Macartney C, Hough RE, Thorn Z, Dillon R, Escherich G, **Cazzaniga G**, Schlegelberger B, Loh ML, Den Boer ML, Moorman AV, Harrison CJ. SSBP2-CSF1R is a Recurrent Fusion in B-lineage Acute Lymphoblastic Leukaemia with Diverse Genetic Presentation and Variable Outcome. Blood. 2021;137:1835-1838.
3. de Barrios O, Galaras A, Trincado JL, Azagra A, Collazo O, Meler A, Agraz-Doblas A, Bueno C, Ballerini P, **Cazzaniga G**, Stam RW, Varela I, De Lorenzo P, Valsecchi MG, Hatzis P, Menéndez P, Parra M. HDAC7 is a major contributor in the pathogenesis of infantt(4;11) proB acute lymphoblasticleukemia. Leukemia. 2021;35:2086-2091.
4. den Boer ML, Cario G, Moorman AV, Boer JM, de Groot-Kruseman HA, Fiocco M, Escherich G, Imamura T, Yeoh A, Sutton R, Dalla-Pozza L, Kiyokawa N, Schrappe M, Roberts KG, Mullighan CG, Hunger SP, Vora A, Attarbaschi A, Zaliova M, Elitzur S, **Cazzaniga G**, Biondi A, Loh ML, Pieters R; Ponte di Legno Childhood ALL Working Group. Outcomes of paediatric patients with B-cell acute lymphocytic leukaemia with ABL-class fusion in the pre-tyrosine-kinase inhibitor era: a multicentre, retrospective, cohort study. Lancet Haematol. 2021;8:e55-e66.
5. Stutterheim J, van der Sluis IM, de Lorenzo P, Alten J, Ancliffe P, Attarbaschi A, Brethon B, Biondi A, Campbell M, **Cazzaniga G**, Escherich G, Ferster A, Kotecha RS, Lausen B, Li CK, Lo Nigro L, Locatelli F, Marschalek R, Meyer C, Schrappe M, Stary J, Vora A, Zuna J, van der Velden VHJ, Szczepanski T,

Valsecchi MG, Pieters R. Clinical Implications of Minimal Residual Disease Detection in Infants With KMT2A-Rearranged Acute Lymphoblastic Leukemia Treated on the Interfant-06 Protocol.J Clin Oncol. 2021;39:652-662

6. Saettini F, L'Imperio V, Fazio G, **Cazzaniga G**, Mazza C, Moroni I, Badolato R, Biondi A, Corti P. More than an 'atypical' phenotype: dual molecular diagnosis of autoimmune lymphoproliferative syndrome and Becker muscular dystrophy.Br J Haematol. 2020;191:291-294.
7. Cazzola A, **Cazzaniga G**, Biondi A, Meneveri R, Brunelli S, Azzoni E. Prenatal Origin of Pediatric Leukemia: Lessons From Hematopoietic Development. Front Cell Dev Biol. 2021;8:618164. **(review)**
8. Saettini F, Poli C, Vengoechea J, Bonanomi S, Orellana JC, Fazio G, Rodriguez FH, Noguera LP, Booth C, Jarur-Chamy V, Shams M, Iascone M, Vukic M, Gasperini S, Quadri M, BarroetaSeijas A, Rivers E, Mauri M, Badolato R, **Cazzaniga G**, Bugarin C, Gaipa G, Kroes WGM, Moratto D, van Oostaijen-Ten Dam MM, Baas F, van der Maarel S, Piazza R, Coban-Akdemir ZH, Lupski JR, Yuan B, Chinn IK, Daxinger L, Biondi A. Absent B cells, agammaglobulinemia, and hypertrophic cardiomyopathy in folliculin-interacting protein 1 deficiency. Blood. 2021;137:493-499
9. van derVelden VHJ, Brüggemann M, **Cazzaniga G**, Scheijen B, Tops B, Trka J, Pal K, Hänzelmann S, Fazio G, Songia S, Langerak AW, Darzentas N; EuroMRD; EuroClonality-NGS Working Group. Potential and pitfalls of whole transcriptome-based immunogenetic marker identification in acute lymphoblastic leukemia; a EuroMRD and EuroClonality-NGS Working Group study. Leukemia. 2021;35:924-928.
10. Della Starza I, Nunes V, Lovisa F, Silvestri D, Cavalli M, Garofalo A, Campeggio M, De Novi LA, Soscia R, Oggioni C, Mussolin L, Biondi A, Guarini A, Valsecchi MG, Conter V, Biffi A, Basso G, Foà R, **Cazzaniga G**. Droplet Digital PCR Improves IG-/TR-based MRD Risk Definition in Childhood B-cell Precursor Acute LymphoblasticLeukemia. Hemasphere. 2021;5:e543
11. Hirabayashi S, Butler ER, Ohki K, Kiyokawa N, Bergmann AK, Möricke A, Boer JM, Cavé H, **Cazzaniga G**, Yeoh AEJ, Sanada M, Imamura T, Inaba H, Mullighan C, Loh ML, Norén-Nyström U, Pastorczak A, Shih LY, Zaliova M, Pui CH, Haas OA, Harrison CJ, Moorman AV, Manabe A. Clinicalcharacteristics and outcomes of B-ALL with ZNF384 rearrangements: a retrospectiveanalysis by the Ponte di Legno Childhood ALL Working Group. Leukemia. 2021;35:3272-3277.
12. Fazio G, Bardini M, De Lorenzo P, Grioni A, Quadri M, Pedace L, Corral L, Palamini S, Palmi C, Buldini B, Vinti L, Parasole R, Barisone E, Zecca M, Favre C, Locatelli F, Conter V, Rizzari C, Valsecchi MG, Biondi A, and **Cazzaniga G**. Recurrentgeneticfusionsredefine MLL-germline acute lymphoblasticleukemia in Infants. Blood. 2021;137:1980-1984
13. Saettini F, Fazio G, Moratto D, Galbiati M, Zucchini N, Ippolito D, Dinelli ME, Imberti L, Mauri M, Melzi ML, Bonanomi S, Gerussi A, Pinelli M, Barisani C, Bugarin C, Chiarini M, Giacomelli M, Piazza R, **Cazzaniga G**, Invernizzi P, Giliani SC, Badolato R, Biondi A. Case Report: HypomorphicFunction and SomaticReversion in DOCK8 Deficiency in OnePatient With TwoNovelVariants and SclerosingCholangitis.FrontImmunol. 2021 Apr16;12:673487
14. Dander E., Palmi C., D'Amico G and **Cazzaniga G**. The bone marrow niche in B-cell acute lymphoblastic leukemia: the role of microenvironment from pre-leukemia to overt leukemia. Int J Mol Sci. 2021;22:4426. (**review**)
15. Tejedor JR, Bueno C, Vinyoles M, Petazzi P, Agraz-Doblas A, Cobo I, Torres-Ruiz R, Bayón GF, Pérez RF, López-Tamargo S, Gutierrez-Agüera F, Santamarina-Ojeda P, Ramírez-Orellana M, Bardini M, **Cazzaniga G**, Ballerini P, Schneider P, Stam RW, Varela I, Fraga MF, Fernández AF, Menéndez P.

Integrative methylome-transcriptomeanalysisunravelscancercellvulnerabilities in infant MLL-rearranged B-cell acute lymphoblasticleukemia.J ClinInvest. 2021;131:e138833

16. Quintarelli C, Guercio M, Manni S, Boffa I, Sinibaldi M, Di Cecca S, Caruso S, Abbaszadeh Z, Camera A, Cembrola B, Ciccone R, Orfao A, Martin-Martin L, Gutierrez-Herrero S, Herrero-Garcia M, **Cazzanig**a G, Nunes V, Songia S, Marcatili P, Marin F, Ruella M, Bertaina V, Vinti L, Del Bufalo F, Algeri M, Merli P, De Angelis B, Locatelli F. Strategy to preventepitopemasking in CAR.CD19+ B-cellleukemiablasts. J ImmunotherCancer. 2021;9:e001514.
17. Buchmann S, Schrappe M, Baruchel A, Biondi A, Borowitz MJ, Campbell M, Cario G, **Cazzaniga G**, Escherich G, Harrison CJ, Heyman M, Hunger SP, Kiss C, Liu H-C, Locatelli F, Loh ML, Manabe A, Mann G, Pieters R, Pui C-H, Rives S, Schmiegelow K, Silverman LB, Stary J, Vora A, Brown PA. Remission, treatment failure, and relapse in pediatric ALL: An international consensus of the Ponte-di-Legno Consortium. Blood. 2022;139:1785-1793
18. Boer JM, Valsecchi MG, Hormann FM, Antić Z, Zaliova M, Schwab C, **Cazzaniga G**, Arfeuille C, Cavé H, Attarbaschi A, Strehl S, Escherich G, Imamura T, Ohki K, Grüber TA, Sutton R, Pastorczak A, Lammens T, Lambert F, Li CK, Carrillo de Santa Pau E, Hoffmann S, Möricke A, Harrison CJ, Den Boer ML, De Lorenzo P, Stam RW, Bergmann AK, Pieters R. Favorable outcome of NUTM1-rearranged infant and pediatric B cell precursor acute lymphoblastic leukemia in a collaborative international study. Leukemia. 2021;35:2978-2982
19. Ceppi F, Rizzati F, Colombini A, Conter V, **Cazzaniga**G.Utilizing the prognostic impact of minimal residual disease in treatment decisions for pediatric acute lymphoblastic leukemia.Expert Rev Hematol. 2021;14:795-807. (**review**)
20. Stewart JP, Gazdova J, Darzentas N, Wren D, Proszek P, Fazio G, Songia S, Alcoceba M, Sarasquete ME, Villarese P, van der Klift MY, Heezen KC, McCafferty N, Pal K, Catherwood M, Kim CS, Srivastava S, Kroeze LI, Hodges E, Stamatopoulos K, Klapper W, Genuardi E, Ferrero S, van den Brand M, **Cazzaniga** G, Davi F, Sutton LA, Garcia-Sanz R, Groenen PJTA, Macintyre EA, Brüggemann M, Pott C, Langerak AW, Gonzalez D; EuroClonality-NGS Working Group. Validation of the EuroClonality-NGS DNA capture panel as an integrated genomic tool for lymphoproliferative disorders. Blood Adv. 2021;5:3188-3198.
21. Russo A, Viberti C, Mareschi K, Casalone E, Guarrera S, Birolo G, **Cazzaniga** G, Corral L, Trentin L, Basso G, Fagioli F, Matullo G. Genetic and Epigenetic Characterization of a Discordant KMT2A/AFF1-Rearranged Infant Monozygotic Twin Pair. Int J Mol Sci. 2021;22:9740.
22. Turati VA, Guerra-Assunção JA, Potter NE, Gupta R, Ecker S, Daneviciute A, Tarabichi M, Webster AP, Ding C, May G, James C, Brown J, Conde L, Russell LJ, Ancliff P, Inglott S, **Cazzaniga** G, Biondi A, Hall GW, Lynch M, Hubank M, Macaulay I, Beck S, Van Loo P, Jacobsen SE, Greaves M, Herrero J, Enver T. Chemotherapy induces canalization of cell state in childhood B-cell precursor acute lymphoblastic leukemia.Nat Cancer. 2021;2:835-852.
23. Antić Ž, Yu J, Bornhauser BC, Lelieveld SH, van der Ham CG, van Reijmersdal SV, Morgado L, Elitzur S, Bourquin JP, **Cazzaniga** G, Eckert C, Camós M, Sutton R, Cavé H, Moorman AV, Sonneveld E, Geurts van Kessel A, van Leeuwen FN, Hoogerbrugge PM, Waanders E, Kuiper RP.Clonal dynamics in pediatric B-cell precursor acute lymphoblastic leukemia with very early relapse.Pediatr Blood Cancer. 2022;69:e29361
24. Stutterheim J, de Lorenzo P, van der Sluin IM, Alten J, Ancliffe P, Attarbaschi A, Aversa L, Boer JM, Biondi A, Brethon B, Diaz P, **Cazzaniga** G, Escherich G, Ferster A, Kotecha RS, Lausen B, Leung AW,

Locatelli F, Silverman L, Stary J, Szczepanski T, van der Velden VHJ, Vora A, Zuna J, Schrappe M, Valsecchi MG, Pieters R. Minimal residual disease and outcome characteristics in infant KMT2A-germline acute lymphoblastic leukaemia treated on the Interfant-06 protocol.Eur J Cancer. 2022;160:72-79

25. Saettini F, Fazio G, Bonati MT, Moratto D, Massa V, Di Fede E, Castiglioni S, Marchetti D, Chiarini M, Sottini A, Iascone M, **Cazzaniga G**, Imberti L, Biondi A, Gervasini C, Badolato R. Identical EP300 variantleading to Rubinstein-Taybisyndrome with differentclinical and immunologicphenotype. Am J Med Genet A. 2022 Mar 9. doi: 10.1002/ajmg.a.62719. Online ahead of print.
26. Bomken S, Enshaei A, Schwalbe EC, Mikulasova A, Dai Y, Zaka M, Fung KT, Bashton M, Lim H, Jones L, Karataraki N, Winterman E, Ashby C, Attarbaschi A, Bertrand Y, Bradtke J, Buldini B, Burke GA, **Cazzaniga G**, Gohring G, De Groot-Kruseman HA, Haferlach C, Nigro LL, Parihar M, Plesa A, Seaford E, Sonneveld E, Strehl S, Van der Velden VH, Rand V, Hunger SP, Harrison CJ, Bacon CM, Van Delft FW, Loh ML, Moppett J, Vormoor J, Walker BA, Moorman AV, Russell LJ. Molecular characterisation and clinical outcome of B-cell precursor acute lymphoblastic leukaemia with IG-MYC rearrangement. Haematologica. 2022 Apr 28. doi: 10.3324/haematol.2021.280557. Online ahead of print. PMID: 35484682
27. Schedel A, Friedrich UA, Morcos MNF, Wagener R, Mehtonen J, Watrin T, Saitta C, Brozou T, Michler P, Walter C, Försti A, Baksi A, Menzel M, Horak P, Paramasivam N, Fazio G, Autry RJ, Fröhling S, Suttorp M, Gertzen C, Gohlke H, Bhatia S, Wadt K, Schmiegelow K, Dugas M, Richter D, Glimm H, Heinäniemi M, Jessberger R, **Cazzaniga G**, Borkhardt A, Hauer J, Auer F. Recurrent Germline Variant in RAD21 Predisposes Children to Lymphoblastic Leukemia or Lymphoma. Int J Mol Sci. 2022 May 5;23(9):5174. doi: 10.3390/ijms23095174. PMID: 35563565
28. Della Starza I, Eckert C, Drandi D, **Cazzaniga G**; EuroMRDConsortium. Minimal Residual Disease Analysis by Monitoring Immunoglobulin and T-Cell Receptor Gene Rearrangements by Quantitative PCR and Droplet Digital PCR. Methods Mol Biol. 2022;2453:79-89. doi: 10.1007/978-1-0716-2115-8_5. PMID: 35622321 (**book chapter**)
29. Lo Nigro L, Andriano N, Buldini B, Silvestri D, Villa T, Locatelli F, Parasole R, Barisone E, Testi AM, Biondi A, Valsecchi MG, Rizzari C, Conter V, Basso G, **Cazzaniga G**. FLT3-ITD in Children with Early T-cell Precursor (ETP) Acute Lymphoblastic Leukemia: Incidence and Potential Target for Monitoring Minimal Residual Disease (MRD). Cancers (Basel). 2022 May 17;14(10):2475. doi: 10.3390/cancers14102475. PMID: 35626079
30. Saitta C, Rebellato S, Bettini LR, Giudici G, Panini N, Erba E, Massa V, Auer F, Friedrich U, Hauer J, Biondi A, Fazio G, **Cazzaniga G**. Potential role of STAG1 mutations in genetic predisposition to childhood hematological malignancies. Blood Cancer J. 2022 Jun 2;12(6):88. doi: 10.1038/s41408-022-00683-9. PMID: 35654786 Free PMC article. No abstract available.

D'Amico

1. Chiu M., Giuseppe Taurino G., Dander E., Bardelli D., FallatiA., Andreoli R., Bianchi M. G., Carubbi C., Pozzi G., Galuppo L., Mirandola P., Rizzari C., Tardito S., Biondi A**., D'Amico G.** and Bussolati O. ALL blasts drive primarymesenchymalstromalcells to increase asparagine availability. Blood Advances. Blood Adv. 2021 Dec 14;5(23):5164-5178. *co-last name
2. Rambaldi B, Diral E, Donsante S, Di Marzo N, Mottadelli F, Cardinale L, Dander E, Isimbaldi G, Pioltelli P, Biondi A, Riminucci M, **D'Amico G**, Elli EM, Pievani A, Serafini M Heterogeneity of the bone marrowniche in patients with myeloproliferativeneoplasms: ActivinAsecretion by mesenchymalstromalcellscorrelates with the degree of marrowfibrosis. ANN HEMATOL 2021 Jan; 100: 105-116 | PMID: 33089365
3. Dander E, Fallati A, Gulić T, Pagni F, Gaspari S, Silvestri D, Cricrì G, Bedini G, Portale F, Buracchi C, Starace R, Pasqualini F, D'Angiò M, Brizzolara L, Maglia O, Mantovani A, Garlanda C, Valsecchi MG, Locatelli F, Biondi A, Bottazzi B, Allavena P, **D'Amico G**Monocyte-macrophagepolarization and recruitmentpathways in the tumourmicroenvironment of B-cell acute lymphoblasticleukaemia. BRIT J HAEMATOL 2021 Jun; 193: 1157-1171 | PMID: 33713428
4. Dander E, Palmi C, **D'Amico G***, Cazzaniga G*. The Bone Marrow Niche in B-Cell Acute Lymphoblastic Leukemia: The Role of Microenvironment from Pre-Leukemia to Overt Leukemia.INT J MOL SCI 2021 Apr; 22: | PMID: 33922612 . *co-last name

Serafini

1) Rambaldi B, Diral E, Donsante S, Di Marzo N, Mottadelli F, Cardinale L, Dander E, Isimbaldi G, Pioltelli P, Biondi A, Riminucci M, D'Amico G, Elli EM, Pievani A, Serafini M. Heterogeneity of the Bone Marrow Niche in Patients with Myeloproliferative Neoplasms: ActivinA Secretion by Mesenchymal Stromal Cells Correlates with the Degree of Marrow Fibrosis. Ann Hematol. 2021 Jan;100(1):105-116. doi: 10.1007/s00277-020-04306-w. Epub 2020 Oct 21.PMID: 33089365
2) Pievani A, Savoldelli R, Poelchen J, Mattioli E, Anselmi G, Girardot A, Utikal J, Bourdely P, Serafini M*, Guermonprez P*. Harnessing Mesenchymal Stromal Cells for the Engineering of Human Hematopoietic Niches.Front Immunol. 2021 Mar 15;12:631279. *equal co-last.
3) Donsante S, Palmisano B, Serafini M, Robey PG, Corsi A, Riminucci M. From Stem Cells to Bone-forming Cells. Int J Mol Sci. 2021 Apr 13;22(8):3989. doi: 10.3390/ijms22083989.
4) Tettamanti S, Pievani A, Biondi A, Dotti G, Serafini M.Catch me if you can: how AML and its niche escape immunotherapy. Leukemia. 2021 Jul 23. doi:10.1038/s41375-021-01350-x.
5) Consonni M, Garavaglia C, Grilli A, de Lalla C, Mancino A, Mori L, De Libero G, Montagna D, Casucci M, Serafini M, Bonini C, Häussinger D, Ciceri F, Bernardi M, Mastaglio S, Bicciato S, Dellabona P, and Casorati G. Human T cells engineered with a leukemia lipid-specific TCR enables donor-unrestricted recognition of CD1c-expressing leukemia. Nature Communications 2021, 12 (1): 4844.
6) Pievani A, Granata V, Desantis G, Antolini L, Ornaghi S, Galleu A, Biondi A, Gentner B, Dazzi F, Serafini M. CD 14 positive cells accelerate hematopoieticstemcellengraftment. Bone Marrow Transplant. 2022 Apr 8. doi: 10.1038/s41409-022-01662-1. Online ahead of print.PMID: 35396529.
7) Biagio Palmisano, Rossella Labella, Samantha Donsante, Cristina Remoli, Emanuela Spica, Ilenia Coletta, Giorgia Farinacci, Michele Dello Spedale Venti, Isabella Saggio, Marta Serafini, Pamela Robey, Alessandro Corsi, Mara Riminucci. GsαR201C and estrogen reveal different subsets of bone marrow adiponectin expressing osteogenic cells. Bone Research, 2022.

8) Michele Dello Spedale Venti, Biagio Palmisano, Samantha Donsante, Giorgia Farinacci, Flavia Adotti, Ilenia Coletta, Marta Serafini, Alessandro Corsi, Mara Riminucci. Morphological and immunophenotypical changes of human bone marrow adipocytes in marrow metastasis and myelofibrosis. Front in Endocrinol,2022.

Gaipa

1) A comprehensive report of long-term stability data for a range ATMPs: A need to develop guidelines for safe and harmonized stability studies.
   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. Cytotherapy. 2022 May;24(5):544-556. doi: 10.1016/j.jcyt.2021.12.004. Epub 2022 Feb 15. PMID: 35177338 Free article.
2) An Extensive Quality Control and Quality Assurance (QC/QA) Program Significantly Improves Inter-Laboratory Concordance Rates of Flow-Cytometric Minimal Residual Disease Assessment in Acute Lymphoblastic Leukemia: An I-BFM-FLOW-Network Report. Maurer-Granofszky M, Schumich A, Buldini B, **Gaipa G**, Kappelmayer J, Mejstrikova E, Karawajew L, Rossi J, Suzan AÇ, Agriello E, Anastasiou-Grenzelia T, Barcala V, Barna G, Batinić D, Bourquin JP, Brüggemann M, Bukowska-Strakova K, Burnusuzov H, Carelli D, Deniz G, Dubravčić K, Feuerstein T, Gaillard MI, Galeano A, Giordano H, Gonzalez A, Groeneveld-Krentz S, Hevessy Z, Hrusak O, Iarossi MB, Jáksó P, Kloboves Prevodnik V, Kohlscheen S, Kreminska E, Maglia O, Malusardi C, Marinov N, Martin BM, Möller C, Nikulshin S, Palazzi J, Paterakis G, Popov A, Ratei R, Rodríguez C, Sajaroff EO, Sala S, Samardzija G, Sartor M, Scarparo P, Sędek Ł, Slavkovic B, Solari L, Svec P, Szczepanski T, Taparkou A, Torrebadell M, Tzanoudaki M, Varotto E, Vernitsky H, Attarbaschi A, Schrappe M, Conter V, Biondi A, Felice M, Campbell M, Kiss C, Basso G, Dworzak MN, On Behalf Of I-Bfm-Flow-Network. Cancers (Basel). 2021 Dec 6;13(23):6148. doi: 10.3390/cancers13236148. PMID: 34885257 Free PMC article.
3) Flow cytometric minimal residual disease assessment in B-cell precursor acute lymphoblastic leukaemia patients treated with CD19-targeted therapies - a EuroFlow study. 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. Br J Haematol. 2022 Apr;197(1):76-81. doi: 10.1111/bjh.17992. Epub 2021 Dec 8. PMID: 34881427
4) 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.
   Kuzilková D, Bugarin C, Rejlova K, Schulz AR, Mei HE, Paganin M, Biffi A, Biondi A, Kalina T, **Gaipa G**. Haematologica. 2022 Jun 1;107(6):1293-1310. doi: 10.3324/haematol.2021.278796. PMID: 34670357 Free PMC article.
5) Therapeutic afucosylated monoclonal antibody and bispecific T-cell engagers for T-cell acute lymphoblastic leukemia.
   Caracciolo D, Riillo C, Ballerini A, **Gaipa G**, Lhermitte L, Rossi M, Botta C, Duroyon E, Grillone K, Gallo Cantafio ME, Buracchi C, Alampi G, Gulino A, Belmonte B, Conforti F, Golino G, Juli G, Altomare E, Polerà N, Scionti F, Arbitrio M, Iannone M, Martino M, Correale P, Talarico G, Ghelli Luserna di Rorà

A, Ferrari A, Concolino D, Sestito S, Pensabene L, Giordano A, Hildinger M, Di Martino MT, Martinelli G, Tripodo C, Asnafi V, Biondi A, Tagliaferri P, Tassone P. J Immunother Cancer. 2021 Feb;9(2):e002026. doi: 10.1136/jitc-2020-002026. PMID: 33597219 Free PMC article.

6) Automated identification of leukocyte subsets improves standardization of database-guided expert-supervised diagnostic orientation in acute leukemia: a EuroFlow study. Lhermitte L, Barreau S, Morf D, Fernandez P, Grigore G, Barrena S, de Bie M, Flores-Montero J, Brüggemann M, Mejstrikova E, Nierkens S, Burgos L, Caetano J, **Gaipa G**, Buracchi C, da Costa ES, Sedek L, Szczepański T, Aanei CM, van der Sluijs-Gelling A, Delgado AH, Fluxa R, Lecrevisse Q, Pedreira CE, van Dongen JJM, Orfao A, van der Velden VHJ; EuroFlow Consortium. Mod Pathol. 2021 Jan;34(1):59-69. doi: 10.1038/s41379-020-00677-7. Epub 2020 Sep 30. PMID: 32999413 Free PMC article.
7) Absent B cells, agammaglobulinemia, and hypertrophic cardiomyopathy in folliculin-interacting protein 1 deficiency. Saettini F, Poli C, Vengoechea J, Bonanomi S, Orellana JC, Fazio G, Rodriguez FH, Noguera LP, Booth C, Jarur-Chamy V, Shams M, Iascone M, Vukic M, Gasperini S, Quadri M, Barroeta Seijas A, Rivers E, Mauri M, Badolato R, Cazzaniga G, Bugarin C, **Gaipa G**, Kroes WGM, Moratto D, van Oostaijen-Ten Dam MM, Baas F, van der Maarel S, Piazza R, Coban-Akdemir ZH, Lupski JR, Yuan B, Chinn IK, Daxinger L, Biondi A. Blood. 2021 Jan 28;137(4):493-499. doi: 10.1182/blood.2020006441. PMID: 32905580 Free PMC article.

Monza, 29/06/2022
L'Organo Amministrativo,
Il Presidente Dr. Luigi Roth

Il Direttore Scientifico Prof. Andrea Biondi