

RELAZIONE DI GESTIONE SCIENTIFICA FONDAZIONE M. TETTAMANTI

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

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

Nel 2015, anno in cui ci siamo proposti di portare in sperimentazione clinica un prodotto interamente sviluppato dalla FT(CARCIKCD19) di cui è stato depositato un brevetto e attualmente attivo, inizia la collaborazione con Formula, azienda Biotech con sede in USA, con la quale mediante un 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 Colmmune (USA), azienda Biotech con una notevole esperienza di ricerca, produzione e sviluppo nel campo delle terapie innovative cellulari e geniche in oncologia, con cui è iniziata una importante collaborazione scientifica di R&D con la FT.

Attualmente sono diversi i progetti che prevedono ricerca e sviluppo (preclinico e clinico) nelle diverse Unità di Ricerca della FT, in particolare quelle della Dr.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 le attività di R&D.

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"CD33/CD123 per eradicare le cellule staminali leucemiche presenti nel midollo osseo dei pazienti LMA (dott.ssa S. Tettamanti)

Nel tradurre la terapia con cellule CAR-CIK nel contesto della leucemia mieloide acuta (LMA), una delle principali sfide è rappresentata dall'identificazione di un antigene bersaglio sufficientemente selettivo, espresso preferenzialmente sulle cellule leucemiche e in particolare sulle cellule staminali leucemiche (LSC), responsabili della persistenza di malattia e delle recidive. Tra gli antigeni maggiormente validati nel contesto della LMA vi sono CD123, noto anche come recettore α dell'interleuchina-3 (IL-3R α), e CD33, entrambi frequentemente sovraespressi sui blasti leucemici e sulle LSC, pur non essendo esclusivi delle cellule tumorali. La co-espressione di CD123 e CD33 è stata osservata fino al 70% dei pazienti affetti da LMA, rendendo questi antigeni particolarmente rilevanti come target terapeutici.

In questo contesto, il gruppo di ricerca ha sviluppato cellule CAR-CIK dirette singolarmente contro CD123 e CD33, dimostrando una potente e specifica attività anti-leucemica sia in vitro sia in vivo, utilizzando linee cellulari e blasti primari di LMA. Al fine di aumentare la selettività verso le cellule staminali leucemiche e, contemporaneamente, ridurre la tossicità "off-tumor/off-target" nei confronti di tessuti sani, incluse cellule staminali ematopoietiche ed endoteliali normali, è stata successivamente sviluppata una piattaforma DualCAR-CIK bi-specifica (CARCIK-CD123/33) in grado di riconoscere simultaneamente CD123 e CD33. Questo approccio consente di colpire in maniera più efficace le cellule leucemiche che co-esprimono entrambi gli antigeni, migliorando il profilo terapeutico e di sicurezza del prodotto.

I risultati preclinici ottenuti sono stati pubblicati sulla rivista scientifica Blood Advances e hanno costituito il razionale scientifico e regolatorio per la preparazione dell' Investigational Medicinal Product Dossier (IMPD) del prodotto CARCIK-CD123/33.

Attualmente, il programma traslazionale è entrato nella fase regolatoria avanzata: il dossier clinico è in fase di assessment da parte del sistema europeo CTIS (Clinical Trials Information System) e di AIFA, nell'ambito della procedura autorizzativa necessaria per l'avvio della sperimentazione clinica first-in-human del prodotto CARCIK-CD123/33 nei pazienti affetti da LMA.

2.2 Sviluppo di un costrutto CAR "bi-specifico"TIM-3/CD33 per eradicare le cellule staminali leucemiche presenti nel midollo osseo dei pazienti LMA (prof. M. Serafini/Dott.ssa S. Tettamanti)

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 stata verificata in vitro ed i risultati in vivo sul modello hanno confermato l'efficacia di questa nuova piattaforma. Ulteriore motivo di innovazione scientifica è aver delucidato il meccanismo che consente il legame esclusivo di questo CAR con il suo antigene corrispondente sulla cellula leucemica e non sulle cellule appartenenti alla normale emopoiesi. L'articolo scientifico che descrive i risultati ottenuti è stato sottomesso ed è attualmente in fase di revisione.

2.3 Sviluppo di cellule CAR-Clk, ingegnerizzate per co-esprimere CXCR4 e CD33.CAR, con aumentata capacità di migrazione e attività antileucemica nella LMA (prof. M. Serafini/dott.ssa A. Pievani)

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 dimostrato che mimando lo stesso meccanismo adoperato dai blasti, le cellule Clk 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-Clk 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. Il team sta lavorando per costruire una traslazione di questo approccio preclinico alla realtà clinica. Lo step successivo di questo progetto è quello di potenziare la persistenza delle cellule CAR-Clk nel midollo osseo, integrando in questo costrutto CAR una segnalazione citochinica altamente regolata. Abbiamo selezionato l'interleuchina-23 (IL-23), una citochina eterodimerica che sembra essere un candidato interessante che potrebbe agire come fattore proliferativo delle cellule T, sostenendone l'espansione e la sopravvivenza. Dopo aver effettuato il clonaggio del nuovo costrutto, si procede con la valutazione del rilascio di questa citochina dalle cellule CAR così modificate al microambiente e l'efficacia di questo nuovo sistema nei confronti della LMA, svolgendo esperimenti mirati in vitro e soprattutto in vivo..

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

2.4 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 bersagliano 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 pubblicato sulla rivista *Frontiers in Immunology*. Abbiamo successivamente sviluppato un modello in vivo per corroborare i dati che dimostrano la proprietà immunomodulatoria delle MSC verso le CAR-T. Lo studio ha identificato un nuovo meccanismo d'azione delle cellule MSC nei confronti della funzionalità delle cellule CARs nella LMA, proponendo di poter ovviare a questa azione bloccante con una classe di farmaci specifici. In particolare, è stato testato un farmaco già disponibile in commercio, il celecoxib, dimostrando come questo sia in grado di bloccare questo meccanismo di immunosoppressione e di ripristinare l'efficacia delle CAR-T. I risultati potrebbero portare allo sviluppo di terapie maggiormente ottimizzate per i pazienti con leucemia trattati con immunoterapia a base di cellule CAR-T. I risultati ottenuti sono stati descritti in un manoscritto attualmente sottomesso a una rivista scientifica.

Questo progetto è svolto in collaborazione con il Prof. Dazzi (King's College, London, UK).

2.5 Come combinare la terapia CARs con un modello di organoide in vivo

Il progetto mira a sviluppare un sistema innovativo che combina le strategie in uso nel nostro laboratorio a base di cellule CAR-T con un organoide tridimensionale di midollo osseo, al fine di studiare l'interazione tra immunoterapia e microambiente emopoietico. Questo modello avanzato consente di valutare l'efficacia e la persistenza delle CAR-T in condizioni più fisiologiche rispetto ai tradizionali modelli bidimensionali, offrendo uno strumento preclinico per ottimizzare le terapie cellulari contro neoplasie ematologiche. Abbiamo lavorato per rendere questo sistema di ingegneria tissutale ideale per lo studio predittivo nelle nuove piattaforme a base di cellule CAR-T.

Il sistema di monitoraggio delle cellule in vivo mediante la tecnologia IVIS è stato implementato e attualmente costituisce una solida piattaforma per lo studio dell'efficienza delle cellule CAR-T in vivo in un modello umanizzato. L'articolo scientifico che descrive questa piattaforma verrà sottomesso a breve ad una rivista scientifica.

2.6. Individuazione di un nuovo asse chemochinico preferenzialmente espresso 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 è stato identificato uno specifico asse che è di straordinario interesse nell'ambito della LMA e si sta valutando il nuovo costrutto realizzato. L'obiettivo finale sarà valutare la capacità delle cellule CAR-T ingegnerizzate con questo specifico recettore chemochinico che permetterà 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. L'identificazione di uno specifico asse chemochinico ha costituito le basi per poter presentare una domanda di brevetto depositata nel 2025.

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

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

La mucopolisaccaridosi 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 contribuiscono 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 ed 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 GAGs, 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 i meccanismi che sono alla base del fenotipo scheletrico della MPS-I e per sviluppare nuovi approcci terapeutici. Questi risultati sono stati descritti in un lavoro recentemente pubblicato sulla rivista Journal of Clinical Investigation Insight.

Il nostro progetto si pone l'obiettivo di chiarire ulteriormente quali siano le alterazioni molecolari alla base del processo di conversione compromesso da cartilagine a osso nella MPS-IH. Utilizzando la trascrittomica spaziale su organoidi derivati da cellule di paziente, ci aspettiamo di identificare modificazioni nei geni del matrisoma,

nei fattori di trascrizione e nelle vie di segnalazione cruciali per la compromissione dell'ipertrofia dei condrociti e la loro transizione a osteoblasti nella MPS-IH. Utilizzando un sistema progettato per studiare l'attività degli osteoclasti matrice-dipendente, ci aspettiamo di identificare geni specifici e vie trascrizionali deregolati negli osteoclasti esposti a una matrice extracellulare (ECM) alterata nella MPS-IH, che porta a una compromissione dell'attività di riassorbimento. Inoltre, l'esame della progressione delle anomalie scheletriche durante lo sviluppo osseo precoce in un modello murino della malattia contribuirà a confermare la rilevanza patofisiologica dei nostri risultati. In definitiva, il nostro obiettivo è individuare i bersagli molecolari critici coinvolti in questi processi che potrebbero essere modulati per attenuare le anomalie scheletriche, che continuano a rappresentare un onere significativo per i pazienti affetti da MPS-IH.

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 prevenire 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. L'articolo che descrive questi risultati è stato pubblicato sulla rivista scientifica *Molecular Therapy*.

Questo progetto è stato svolto in collaborazione con la Prof.ssa Riminucci M (Dipartimento di Anatomia Patologica, Policlinico Umberto I, Università La Sapienza, Roma), con il Professor Tomatsu S (Hospital for Children di Wilmington, 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 (ricercatrice IRCCS San Gerardo dei Tintori), dott.ssa Samantha Donsante (Post-Doc), dott.ssa Carlotta Guzzetti (Post-Doc), dott.ssa Mara Algeri (studentessa di dottorato DIMET, Unimib), dott.ssa Erica Grassenis (studentessa di dottorato DIMET, Unimib), dott.ssa Camilla Firpo (studentessa di dottorato DIMET, Unimib).

Pubblicazioni scientifiche del Centro Tettamanti (2025)- Serafini

- 6) Lisi-Vega LE, Pievani A, García-Fernández M, Forte D, Williams TL, Serafini M, Méndez-Ferrer S. Bone marrow mesenchymal stromal cells support translation in refractory acute myeloid leukemia. *Cell Rep.* 2025 Jan 28;44(1):115151. doi: 10.1016/j.celrep.2024.115151.
- 7) Pisani I, Melita G, Borges de Souza P, Galimberti S, Savino AM, Sarno J, Landoni B, Crippa S, Gotti E, Cuofano C, Pedrini O, Capelli C, Matera G, Belotti D, Cesana S, Cabiati B, Quaroni M, Colombo V, Mazza M, Vergani B, Gaimari A, Nicolini F, Tazzari M, Bocchini M, Serafini M, Rambaldi A, Rambaldi B, Dastoli G, Biondi A, Gaipa G, Introna M, Golay J, Tettamanti S. Optimized GMP-grade production of non-viral Sleeping Beauty-generated CARCIK Cells for enhanced fitness and clinical scalability. *J Transl Med.* 2025 May 19;23(1):559. doi: 10.1186/s12967-025-06416-3.
- 8) Neonatal gene therapy effectively prevents disease manifestations in a murine model of Mucopolysaccharidosis type I. De Ponti G, Santi L, Dina G, Pievani A, Donsante S, Riminucci M, Corsi A, Khan S, Passerini L, Annoni A, Gregori S, Crippa S, Biondi A, Quattrini A, Tomatsu S, Aiuti A, Bernardo ME, Serafini M. *Mol Ther Methods Clin Dev.* 2025 Jul 30;33(3):101544. doi: 10.1016/j.omtm.2025.101544.
- 9) Advancing CIK cell immunotherapy: highlights from the second international conference on DC-CIK and CAR-CIK approaches. Sharma A, Sangiolo D, Rosato A, Pu J, Hou J, Tettamanti S, Serafini M, Fenix KA, Introna M, Rambaldi A, Ren X, Schmidt-Wolf IGH. *Cancer Immunol Immunother.* 2025 Nov 3;74(12):361. doi: 10.1007/s00262-025-04216-8.PMID: 41182377.
- 10) Effects of anti-RANKL, Zoledronate or combination therapy in a mouse model of fibrous dysplasia: a preclinical study. Palmisano B, Tavanti C, Farinacci G, Corsi A, Serafini M, Appelman-Dijkstra NM, Riminucci M. *J Bone Miner Res.* 2026 Feb 24;zjag037. doi: 10.1093/jbmr/zjag037. Online ahead of print.PMID: 41732798.
- 11) A comprehensive study on the effect of alglucosidase alpha and immunomodulation on survival, motor and cardiac outcome, creatine kinase and antibody titers in classic infantile Pompe disease: the Monza experience. Faraguna MC, Crescitelli V, Bonanomi S, Kullmann GA, Boffi ML, Pretese R, Risca G, Tedesco LM, Pozzi K, Serafini M, van den Hout JM, van der Ploeg AT, Balduzzi AC, Gasperini S. *Curr Opin Immunol.* 2026 Apr; 99:102725. doi: 10.1016/j.coi.2026.102725. Epub 2026 Jan 22. PMID: 41576647.
- 12) Exploring bone formation mechanism and pattern during RANKL inhibition in a fibrous dysplasia mouse model. Farinacci G, Coletta I, Palmisano B, Spica E, Tavanti C, Di Cristofano S, Donsante S, Serafini M, Borsello T, Venneri MA, Corsi A, Salerno D, Donati B, Ciarrocchi A, Raimondo D, Riminucci M. *Commun Biol.* 2026 Apr 22. doi: 10.1038/s42003-026-10097-z.
- 13) High-avidity Cathepsin G specific CAR-T cells for the treatment of Acute Myeloid Leukemia. T. Walhart, F. Song, M. Biondi,, S. Stucchi, G. Li, P. Peishun, K. Suzuki, E. G. Hunt, A. Kennedy , J. E. Thaxton, T. Withers , L. E. Herring, C.G. Elliott, S. A. Hunsucker, R. Tsahouridis, M. Serafini , L. Flick, E. I. Lichtman, M. Woodcock, L. Su, Z. Yang, G. Xiong , Z. Cui , P. Wang, C. Liu, B. Savoldo, P. M. Armistead, G. Dotti. *Blood*, in press

Unità di Ricerca Dott.ssa Giovanna D'Amico

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:

1) 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-stimate 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).

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

I meccanismi alla base della protezione metabolica delle cellule leucemiche da parte delle cellule mesenchimali stromali (MSC) vengono analizzati mediante l'identificazione delle vie metaboliche proleucemiche, mediante un approccio metabolomico e di caratterizzazione degli effetti di ActivinA sul metabolismo delle MSC e delle cellule leucemiche. In particolare (in collaborazione con il Prof. O. Bussolati, Università di Parma), abbiamo dimostrato che Le MSC del midollo osseo stimulate con le cellule leucemiche si 'convertono' al fine di secernere l'asparagina (Asn), aumentare l'espressione del trasportatore di membrana di tale aminoacido (SNAT5) e di un'enzima (glutamina sintasi) fornendo un microambiente stromale favorevole per la sopravvivenza delle cellule leucemiche trattate con asparaginasi. 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.

Questo progetto è svolto in collaborazione con Prof. Ovidio Bussolati (Parma)

3) Combinare le terapie anti-leucemiche 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 ActivinA nel sangue sono risultati direttamente correlati con la percentuale di cellule leucemiche infiltranti il midollo. La somministrazione di una trappola molecolare per ActivinA 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 ActivinA 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 ActivinA 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 ActivinA potrebbe essere una strategia promettente per migliorare i tassi di cura dei pazienti pediatrici con LLA-B, refrattari alla chemioterapia tradizionale.

4) 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-tumoral, 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.

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

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.

Questo progetto è svolto in collaborazione con Prof Francesco Peri (università Milano- Bicocca)

6) Studio del microambiente tumorale nella LLA nei pazienti resistenti alla terapia

Lo studio del microambiente rappresenta oggi un ambito di ricerca fondamentale per comprendere i meccanismi di resistenza terapeutica. In particolare, una parte di pazienti trattati con Blinatumomab (Blin) sviluppa resistenza o non raggiunge una risposta clinica soddisfacente. Il microambiente midollare, costituito da cellule immunitarie e cellule stromali, in particolare le MSC, svolge un ruolo cruciale nella sopravvivenza delle cellule leucemiche e nella modulazione della risposta immunitaria. Questo studio si propone di analizzare in maniera approfondita le differenze cellulari, molecolari e citochiniche tra pazienti responder e non responder alla terapia con Blinatumomab. Verranno caratterizzate le diverse popolazioni cellulari del midollo osseo mediante tecniche di immunofenotipizzazione multiparametrica e analisi single-cell. Parallelamente saranno investigate le alterazioni trascrittomiche, i pathway molecolari coinvolti nella resistenza terapeutica, così come le citochine plasmatiche nelle due coorti di pazienti. Particolare attenzione sarà dedicata alle interazioni tra cellule leucemiche, comparto stromale e sistema immunitario. L'identificazione di specifiche firme biologiche del microambiente potrebbe consentire di predire la risposta alla terapia e individuare nuovi bersagli terapeutici. I risultati attesi contribuiranno allo sviluppo di approcci terapeutici più personalizzati ed efficaci nei pazienti affetti da LLA.

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:

1) 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 ATP rispetto alle HD-MSC. Tale difetto mitocondriale è dovuto in particolare ad una riduzione del 61% dell'attività del complesso IV. 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.

2) studio dell'effetto di antiossidanti (DMSO e NAC) sul metabolismo delle SDS-MSC.

Abbiamo stimolato le SDS MSC per 48h con 0.05% di dimetilsolfossido (DMSO), molecola che a basse concentrazioni agisce come antiossidante riducendo in particolare i livelli di perossidazione lipidica. Sorprendentemente, le SDS-MSC stimulate recuperano significativamente la capacità di formare strutture simil-capillari su Matrigel. In aggiunta, la reversione angiogenica delle SDS-MSC è accompagnata da un ripristino metabolico (n=6). Le SDS-MSC stimulate 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

3) Studio del contenuto di Fe^{2+} / Fe^{3+} e ferroptosi nelle SDS-MSC

Il ferro intracellulare, presente come Fe^{2+} (ferroso) e Fe^{3+} (ferrico), gioca un ruolo cruciale nell'omeostasi cellulare. L'alterazione del suo equilibrio redox può promuovere stress ossidativo e innescare ferroptosi, una forma di morte cellulare non apoptotica ferro-dipendente. Verrà determinata la quantificazione di Fe^{2+} e Fe^{3+} in cellule isolate da pazienti affetti da SDS e verranno trattate con agenti riducenti per stimare il ferro totale. Le cellule saranno inoltre trattate con inibitori di GPX4 e chelanti del ferro per valutare la suscettibilità alla ferroptosi e per comprendere se riducendo la quantità di Fe intracitoplasmatica verrà ripristinata la capacità di

formare tubuli in saggi di matrigel. Verranno analizzati i livelli di perossidazione lipidica, vitalità cellulare e alterazioni morfologiche tipici di ferroptosi.

Questo progetto è svolto in collaborazione con Prof Doufur (Genova)

4) 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.

5) Studio delle biopsie midollari dei pazienti affetti SDS mediante CODEX (CO-Detection by Indexing).

Questa tecnologia di imaging spaziale permette di analizzare simultaneamente decine di marcatori proteici all'interno dello stesso campione tissutale, mantenendo l'informazione spaziale e l'architettura del tessuto. L'approccio permetterà di caratterizzare in maniera dettagliata le popolazioni ematopoietiche, immunitarie, stromali e vascolari presenti nel microambiente midollare, coinvolte nei processi di disfunzione midollare. L'analisi single-cell e spaziale consentirà di identificare eventuali alterazioni cellulari e molecolari associate alla progressione della malattia. Inoltre, la tecnologia CODEX permetterà di studiare l'organizzazione topologica delle cellule e le reti di comunicazione presenti nel microambiente. I dati ottenuti contribuiranno a una migliore comprensione della patogenesi della SDS e all'identificazione di potenziali biomarcatori diagnostici e terapeutici.

Questo progetto verrà svolto in collaborazione con la [Dot.sa](#) S. valletta (Head of Leukaemic Stem Cell Niche Group, Cancer Research Center, | Manchester (UK)

L'Unità della Dr.ssa D'Amico è costituita da una staff scientist (Erica Dander), da 1 Post-Doc (Alessandra Fallati,), 2 (Alice Giussani, Jennifer Romagnoli)

Pubblicazioni 2025:

1. Taurino G, Griffini E, Toscani D, Maccari C, Tardito S, Bianchi MG, Casati L, Dander E, D'Amico G, Andreoli R, Giuliani N, Bussolati O, Chiu M. A metabolic trade-off between malignant plasma cells and mesenchymal stromal cells sustains multiple myeloma growth. 2026 ; Blood Neoplasia.14;3(2):100195.
2. Bezzerri V, Pegoraro A, Hristodor AM, Crane GM, Meneghelli I, Brignole C, Boni C, Baldisseri E, Vella A, Menichetti G, Valli R, Porta G, D'Amico G, Tecchio C, Parisi A, Lippi G, Mercuri A, Cesaro S, Corey SJ, Cipolli M. Ataluren improves hematopoietic and pancreatic disorders in Shwachman-Diamond syndrome patients:

- a compassionate program case-series. *Nat Commun.* 2025 Sep 2;16(1):8189. doi: 10.1038/s41467-025-63137-3
3. Dander E, Pischiutta F, Di Marzo N, Pascente R, Panini N, Fallati A, Biondi A, Zanier ER, D'Amico G. Development of a 3D ex vivo model of brain-leukemia interaction to study the role of activin A in the central nervous system microenvironment. *Sci Rep.* 2025 May 29;15(1):18915. doi: 10.1038/s41598-025-03877-w.
 4. D'Amico G, Starace R, Della Lastra M, Marimpietri D, Dander E, Morandi F, Airoidi I. Dysregulation of the Bone Marrow Microenvironment in Pediatric Tumors: The Role of Extracellular Vesicles in Acute Leukemias and Neuroblastoma. *Int J Mol Sci.* 2025 Jun 4;26(11):5380. doi: 10.3390/ijms26115380.
 5. Tonelli R, Pischiutta F, Elice F, Zanier ER, Grisendi G, Astori G, Samarelli AV, Bruzzi G, Manicardi L, Spano C, Nattino G, Signorini F, Bernardi M, Catanzaro D, Merlo A, Lisi I, Pasetto L, Bonetto V, Fiammenghi L, Boschi L, Guidi S, Candini O, Zoerle T, Dander E, D'Amico G, De Pierri F, Maur M, Pettorelli E, Ruggieri V, Cerri S, Mari G, De Berardis G, Mighali P, Baschieri MC, Lazzari L, Bambi F, Ciccocioppo R, Clini E, Dominici M; RESCAT study group. Impact of mesenchymal stromal/stem cell infusions on circulating inflammatory biomarkers in COVID-19 patients: analysis of a phase I-IIa trial. *Cytotherapy.* 2025 Sep;27(9):1105-1115. doi: 10.1016/j.jcyt.2025.04.059. Epub 2025 Apr 7.
 6. Sabbioni G, D'Aversa E, Breveglieri G, Altieri MT, Boni C, Pegoraro A, Finotti A, Gambari R, D'Amico G, Vella A, Lippi G, Cipolli M, Bezzeri V, Borgatti M. Constitutive systemic inflammation in Shwachman-Diamond Syndrome. *Mol Med.* 2025 Feb 28;31(1):81. doi: 10.1186/s10020-025-01133-5.
 7. Tonelli R, Pischiutta F, Elice F, Zanier ER, Grisendi G, Astori G, Samarelli AV, Bruzzi G, Manicardi L, Spano C, Nattino G, Signorini F, Bernardi M, Catanzaro D, Merlo A, Lisi I, Pasetto L, Bonetto V, Fiammenghi L, Boschi L, Guidi S, Candini O, Zoerle T, Dander E, D'Amico G, De Pierri F, Maur M, Pettorelli E, Ruggieri V, Cerri S, Mari G, De Berardis G, Mighali P, Baschieri MC, Lazzari L, Bambi F, Ciccocioppo R, Clini E, Dominici M; RESCAT study group. Impact of mesenchymal stromal/stem cell infusions on circulating inflammatory biomarkers in COVID-19 patients: analysis of a phase I-IIa trial. *Cytotherapy.* 2025 Apr 7:S1465-3249(25)00677-2. doi: 10.1016/j.jcyt.2025.04.059.
 8. Erica Dander , Francesca Pischiutta , Noemi Di Marzo , Rosaria Pascente , Nicolò Panini , Alessandra Fallati , Andrea Biondi , Elisa R Zanier , Giovanna D'Amico. Development of a 3D ex vivo model of brain-leukemia interaction to study the role of activin A in the central nervous system microenvironment . *Sci Rep* 2025. 15(1):18915. doi: 10.1038/s41598-025-03877-w.

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

A. Progetti di ricerca

1. Caratterizzazione e drug targeting di sotto gruppi 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.

Task 1.1. Pazienti con LAL-T associata a overespressione di CRLF2 (Project Leader: Chiara Palmi)

CRLF2 è un recettore appartenente alla famiglia delle citochine di tipo I, cruciale per la sopravvivenza, la proliferazione e la differenziazione delle cellule linfoide. Quando CRLF2 è sovraespresso in seguito ad alterazioni molecolari, questa segnalazione diventa costitutivamente attiva, favorendo così la proliferazione incontrollata delle cellule trasformate. Sebbene questo meccanismo sia ampiamente documentato nella B-ALL, la sua presenza nella T-ALL è più rara e meno studiata.

Abbiamo per la prima volta descritto casi in cui la T-ALL presenta una sovraespressione aberrante di CRLF2, talvolta accompagnata da mutazioni concomitanti nei geni JAK1, JAK2, IL7R o STAT5B, che amplificano ulteriormente il segnale oncogenico. Questi casi rappresentano sottotipi molecolari peculiari di T-ALL, caratterizzati da una spiccata attivazione delle vie di segnalazione citochiniche, in particolare JAK-STAT e PI3K/AKT/mTOR, una maggiore resistenza ai corticosteroidi, una risposta sub ottimale alla chemioterapia di induzione e una prognosi sfavorevole, anche se le evidenze in tal senso sono ancora parziali e in evoluzione.

Nella T-ALL non sono stati identificati i tipici riarrangiamenti osservati nella B-ALL e l'espressione del recettore non sembra localizzarsi sulla superficie cellulare, ma piuttosto a livello intracellulare. Sebbene CRLF2 rappresenti un target biologicamente interessante e associato a prognosi sfavorevole, sono necessari ulteriori studi preclinici nei modelli di T-ALL per validarne il potenziale terapeutico. Lo scopo del progetto è quello di identificare dal profilo di espressione genica nuovi casi e integrare queste conoscenze molecolari nella pratica clinica, attraverso lo studio di farmaci innovativi, per migliorare l'accuratezza diagnostica e l'efficacia dei trattamenti nei pazienti con T-ALL ad alto rischio. In tale contesto, strategie basate su piccole molecole potrebbero risultare più appropriate rispetto ad approcci immunoterapici diretti contro antigeni di superficie.

(Finanziamento: grant PRIN Cazzaniga 2024-2026)

Task 1.2. Pazienti con LAL-T associata a riarrangiamento del gene KMT2A (Project Leader: Michela Bardini)

Il riarrangiamento del gene KMT2A nella T-ALL rappresenta un evento raro ma associato a una malattia molto aggressiva, soprattutto nei pazienti pediatrici molto piccoli. Scopo del progetto è identificare attraverso analisi del trascrittoma nuovi casi, esplorare in vitro ed in vivo l'efficacia di nuovi farmaci.

I risultati preliminari mostrano che i pazienti KMT2Ar presentano livelli più elevati di malattia minima residua (MRD) e una maggiore frequenza di scarsa risposta al prednisone, indicando un fenotipo clinico ad alto rischio. Inoltre, è stata osservata un'elevata espressione di Menin-1, suggerendo un possibile bersaglio terapeutico. Gli

inibitori di Menin, in particolare Revumenib, hanno dimostrato attività antileucemica variabile ma promettente, con effetti sinergici in combinazione con desametazone e venetoclax. Questi risultati contribuiscono a una migliore caratterizzazione biologica della KMT2Ar T-ALL e supportano lo sviluppo di nuove strategie terapeutiche mirate per questo sottogruppo ad alto rischio.

(Finanziamento: grant PRIN a Cazzaniga 2024-2026, abstract a AIEOPinLab)

Task 1.3. Targeting dei riarrangiamenti del gene PAX5 (Project Leader: Grazia Fazio)

Alterazioni di PAX5 sono presenti in >30% dei pazienti con LLA, di cui una quota è costituita da traslocazioni cromosomiche (LLA PAX5r). Dati clinici e prognostici della LLA PAX5r sono ad oggi limitati. Questo studio si propone di descrivere le caratteristiche clinico-biologiche della coorte AIEOP di pazienti LLA PAX5r ed esplorare nuovi potenziali target terapeutici.

Inizialmente, sono stati inclusi 58 pazienti con LLA PAX5r diagnosticati nel periodo 2002-2024 e trattati secondo i protocolli AIEOP-BFM-ALL/Interfant-06. Si è osservato un alto tasso di iperleucocitosi (32%), scarsa risposta al prednisone (PPR) (20%) ed elevata flow-MRD al giorno+15 (25%). Alla fine dell'induzione, il 73% risultava MRD-positivo ed il 32% è rimasto positivo al termine del consolidamento. Il 37% è stato classificato come basso-rischio, 29% rischio-intermedio e 34% alto-rischio 5-y EFS ed OS sono risultate $54\pm 9\%$ ed $81\pm 7\%$, rispettivamente. Recentemente abbiamo avuto la possibilità di raccogliere retrospettivamente i dati clinici di tutti i pazienti (<18 anni) con nuova diagnosi di leucemia linfoblastica acuta (PAX5r) arruolati negli studi consecutivi AIEOP-BFM o negli studi osservazionali condotti, non solo in Italia (AIEOP), ma anche in Germania e Austria tra il 2001 e il 2024. Complessivamente, così la coorte dei pazienti PAX5r è estesa a 165 pazienti con leucemia linfoblastica acuta, ed abbiamo confermato anche nella coorte estesa l'inferiore risposta ai trattamenti. Tra i PAX5r sono stati identificati sessantacinque diversi partner genici di fusione, con JAK2 (n=22), NOL4L (n=18), AUTS2 (n=13) ed ETV6 (n=12) come i più frequenti. L'età mediana era di 3,4 anni (0,4-17,8) e il 66,1% dei pazienti era di sesso maschile (*progetto di PhD di Dr. Nicolò Peccatori*).

Abbiamo tratto vantaggio proprio dagli studi di espressione genica, ed abbiamo verificato che il gene FLT3, che è noto come direttamente represso da PAX5 wild-type, è invece overespresso in presenza di riarrangiamenti di alterazioni di PAX5. Quindi, abbiamo ipotizzato un potenziale ruolo di FLT3 nel mantenimento della sopravvivenza nella fase blastica della leucemia linfoblastica acuta con PAX5r e abbiamo studiato l'efficacia del targeting di FLT3 in questo sottotipo di leucemia linfoblastica acuta. Quindi abbiamo testato 174 molecole e farmaci già approvati da FDA per altri tipi di tumore, usando una piattaforma di screening farmacologico, inclusi N=10 inibitori di FLT3 (FLT3i). Abbiamo effettuato esperimenti di vitalità/apoptosi sia sulla linea cellulare PAX5r (NALL-1) che sui blasti derivati dai pazienti PAX5r in co-coltura con cellule stromali del midollo osseo umano, e tra i farmaci usati 8/10 si sono rivelati efficaci e tra loro abbiamo selezionato Gilteritinib (GILT), che emerge come un agente promettente sia in termini di efficacia che per profilo di tossicità ematologica anche in pazienti pediatrici affetti da altri tipi di leucemia. Abbiamo a breve termine l'obiettivo di approfondire l'uso di questo farmaco GILT, che per la prima volta verrebbe impiegato nella LLA, e sarà fondamentale testarne l'efficacia anche in combinazione con i farmaci chemioterapici impiegati ad oggi nei protocolli di cura pediatrici (*progetto di PhD di Dr. Alessia Curto*).

Assolutamente innovativo poi è l'approccio di targeting della leucemia PAX5r andando a colpire ed alterare il profilo metabolico del tumore, infatti l'inibizione delle risorse energetiche delle cellule potrebbe compromettere significativamente la loro sopravvivenza. Il profilo metabolico è stato eseguito su campioni di cellule derivate da pazienti PAX5r e sulla linea cellulare NALL-1 (con PAX5::ETV6) mediante CyToF, disponibile in laboratorio; con questi esperimenti abbiamo confrontato l'espressione degli enzimi metabolici dei pazienti con quella delle cellule B sane del midollo osseo di donatori, sia in cellule non trattate sia dopo trattamento con il composto 2-desossi-D-glucosio (2-DG). Inoltre, abbiamo in corso la messa a punto della misurazione del metabolismo funzionale, che è possibile mediante lo strumento Seahorse, disponibile in laboratorio, su linee cellulari non trattate e trattate con 2-DG e su cellule derivate da pazienti PAX5r (*progetto di PhD di Dr. Rebecca Rapisarda*).

(finanziamento grant AIRC IG Fazio 2024-2028, manoscritto in revisione su Blood dal titolo "Minimal Residual Disease-Dependent Unfavorable Outcomes in Pediatric PAX5-Rearranged B-Acute Lymphoblastic Leukemia")

Task 1.4. Targeting dei riarrangiamenti di JAK2 (PostDoc Manuel Quadri, borsa triennale AIRC PostDoc, terminata a febbraio 2025)

In una coorte di pazienti pediatrici di LAL-B ad alto rischio, tramite NGS abbiamo identificato 11 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, sono stati eseguiti esperimenti di analisi single cell con CytOFF e del profilo metabolico cellulare associato a riarrangiamento di JAK2. I risultati di questo studio sono stati recentemente accettati come pubblicazione dal titolo "Efficacy of the kinase inhibitor CHZ868 against JAK2 rearrangements in pediatric acute lymphoblastic leukemia. *Haematologica*. 2026 Apr 16. doi: 10.3324/haematol.2025.287840. PMID: 41988773".

(Finanziamento: grant PRIN a Cazzaniga dal 2024)

2. Ruolo del gene MSI2 nella leucemia linfoblastica acuta infant con riarrangiamento del gene MLL (Project Leader: Michela Bardini, PostDoc Luigia Valsecchi, PhD Student Simona Procopio)

Musashi-2 (MSI2) è una proteina che lega RNA (RNA-binding protein, RBP) con un ruolo fondamentale nell'ematopoiesi normale e patologica. Nella leucemia linfoblastica acuta infantile con riarrangiamento di KMT2A/MLL (KMT2Ar infant ALL), uno dei sottotipi pediatrici a prognosi più sfavorevole, MSI2 emerge come un importante regolatore della leucemogenesi e della resistenza terapeutica.

Nei pazienti pediatrici con KMT2Ar ALL abbiamo osservato un'espressione significativamente più elevata di MSI2 rispetto ai casi non KMT2A-riarrangiati, e livelli aumentati alla diagnosi risultano associati a scarsa risposta

alla terapia e maggiore rischio di recidiva. Dal punto di vista funzionale, l'inibizione genetica di MSI2 determina una riduzione della crescita cellulare leucemica, della capacità di mantenimento della malattia e del potenziale leucemogenico in modelli sperimentali in vitro e in vivo. Inoltre, MSI2 appare strettamente collegata al programma trascrizionale KMT2A/HOXA9: il riarrangiamento di KMT2A promuove l'espressione di HOXA9, che a sua volta induce l'espressione di MSI2, mentre MSI2 stabilizza la traduzione di HOXA9, generando un circuito autoregolatorio che sostiene il fenotipo leucemico.

Un aspetto innovativo emerso dallo studio riguarda il ruolo metabolico di MSI2. L'analisi trascrittomica ha mostrato che i bersagli diretti di MSI2 comprendono geni coinvolti nel metabolismo mitocondriale, nella fosforilazione ossidativa (OxPhos) e nella produzione energetica cellulare. Le cellule con elevata espressione di MSI2 mantengono un'attività mitocondriale efficiente anche in presenza di glucocorticoidi, favorendo la sopravvivenza cellulare e contribuendo alla resistenza terapeutica. Al contrario, la perdita di MSI2 compromette la funzione mitocondriale, aumenta la sensibilità ai glucocorticoidi e induce una crisi energetica che culmina nella morte cellulare.

Nel complesso, i dati indicano MSI2 come un potenziale biomarcatore prognostico e un promettente bersaglio terapeutico nella leucemia infantile KMT2A-riarrangiata. Il targeting diretto di MSI2 o delle vulnerabilità metaboliche mitocondriali associate potrebbe rappresentare una nuova strategia per migliorare la risposta ai trattamenti e ridurre il rischio di recidiva nei pazienti ad alto rischio.

(Valsecchi L. et al., manoscritto in revisione su Leukemia)

(finanziamento grant Fight Kids Cancer 2023-2025 a Cazzaniga)

3. Caratterizzazione della fase pre-leucemica della LAL del bambino (Project Leader Chiara Palmi)

(Finanziamento Grant AIRC 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 (PostDoc Mayla Bertagna, borsa triennale AIRC PostDoc 2023-2025)

Le cellule pre-leucemiche E/R mostrano una maggiore suscettibilità alla trasformazione a seguito di ulteriori insulti genetici, che innescano lo sviluppo di leucemia nell'1% dei casi E/R. Si ritiene che una risposta immunitaria e infiammatoria disregolate a infezioni comuni sia il principale attore nella trasformazione maligna E/R+, che porta all'acquisizione di mutazioni secondarie. 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. Lo studio ha analizzato il ruolo del microambiente midollare nella fase pre-leucemica della ALL ETV6::RUNX1, con particolare attenzione alle interazioni tra cellule ematopoietiche e nicchia midollare. L'analisi ha incluso sia cellule staminali/progenitrici ematopoietiche (HSPCs) sia progenitori B, evidenziando differenze nel loro comportamento biologico e nelle modalità di interazione con il microambiente osseo. In particolare, le diverse popolazioni cellulari hanno mostrato differenti capacità di migrazione, adesione, mobilitazione e risposta agli stimoli ambientali. I risultati suggeriscono che, nel contesto pre-leucemico, i compartimenti ematopoietici non siano coinvolti in maniera uniforme, ma presentino caratteristiche specifiche dipendenti dallo stadio di differenziamento. Tali differenze potrebbero contribuire alla persistenza di cellule pre-leucemiche o leucemiche all'interno di nicchie protettive del midollo osseo, rappresentando possibili vulnerabilità terapeutiche da sfruttare per limitare la progressione della malattia.

(Abstract 2025 Bertagna M: FEBS Workshop; EHA congress).

Task 2.2. Senescenza indotta da oncogene nella pre-leucemia ETV6/RUNX1 positiva: ruolo e possibile targeting (Junior PostDoc Denise Acunzo)

La traslocazione t(12;21)(p13;q22), che genera il gene di fusione ETV6::RUNX1 (E::R), rappresenta l'alterazione cromosomica più frequente nella leucemia linfoblastica acuta pediatrica dei precursori B (BCP-ALL). Sebbene il riarrangiamento sia presente anche in una quota di neonati sani, esso non è sufficiente da solo a indurre la trasformazione leucemica, ma determina uno stato pre-leucemico silente.

Abbiamo dimostrato che l'espressione di E::R induce nelle cellule ematopoietiche immature un fenotipo compatibile con senescenza indotta da oncogene (OIS), caratterizzato da rallentamento del ciclo cellulare, aumento dell'attività β -galattosidasi, incremento dello stress ossidativo e secrezione di fattori associati al fenotipo secretorio della senescenza (SASP). Inoltre, E::R altera la via di p53, promuovendo l'arresto del ciclo cellulare ma riducendo l'attivazione dell'apoptosi, conferendo così un vantaggio di sopravvivenza in condizioni di stress genotossico. Sono stati identificati potenziali approcci terapeutici mirati, in particolare farmaci senolitici in grado di eliminare selettivamente le cellule E::R positive sfruttandone le caratteristiche metaboliche e biologiche. Questi risultati suggeriscono che il targeting della senescenza cellulare possa rappresentare una strategia innovativa per prevenire la progressione leucemica e ridurre il rischio di recidiva nei portatori di ETV6::RUNX1.

Il progetto si avvale di numerose collaborazioni nazionali e internazionali: *Prof.ssa L. Russo, Dip. di Chimica Bioorganica, Unimib* per studiare gli effetti delle cellule pre-leucemiche sul microambiente; *Prof.ssa D. Besozzi, Informatica, Unimib* per lo sviluppo di un modello computazionale di pre-leucemia E/R+, utilizzando metodologia *fuzzy logic* per prevedere il comportamento delle cellule pre-leucemiche dopo perturbazione del

sistema mediante l'introduzione di stimoli appropriati (es. danno al DNA); *Dr. I.Sanchez-Garcia, Salamanca, Spain* per la validazione di in un modello murino pre-leucemico E/R+ in vivo (SCA1-E/R) e la capacità del gene di fusione di indurre OIS.

(Acunzo D. et al., Targeting oncogene-induced senescence in ETV6::RUNX1 pre-leukemic cells. Cell Death Discov. 2026;12:145 ; Abstract 2025 Acunzo D: FEBS Workshop; ESH 4th Translational Research Conference on Acute Lymphoblastic Leukaemia; EHA congress)

(Grant AIRC-IG Cazzaniga 2024-28)

4. Predisposizione genetica a LAL pediatrica (Project Leader G.Cazzaniga)

(Finanziamento Grant AIRG IG a Cazzaniga 2024-2028)

E' sempre più evidente che alcune condizioni genetiche ben note predispongono 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 prospettiva di predisposizione a leucemia nel protocollo AIEOP-BFM ALL 2017.

A protocollo chiuso, stiamo raccogliendo i dati del questionario per tutti i bambini italiani con LAL arruolati nel protocollo AIEOP-BFM ALL 2017 (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 Exome Sequencing, Whole Transcriptome analysis).

Vari studi familiari sono in corso.

(Abstract per Congresso AIEOP 2024 e Congresso SIGU 2024)

B. Board panel multidisciplinare di esperti.

Proseguono gli incontri mensili del 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 pazienti LAL (PostDoc S.Rebellato; Lucia Bruno, ricercatrice Unimib).

In collaborazione con Prof. M. Capasso (Napoli), abbiamo analizzato il profilo genetico germinale di 846 pazienti pediatrici con leucemia linfoblastica acuta a precursori B (B-ALL) (circa 400 casi con esordio a Monza) mediante sequenziamento dell'esoma (WES), con l'obiettivo di identificare varianti associate alla predisposizione alla malattia. Varianti patogenetiche o probabilmente patogenetiche nei geni di predisposizione al cancro sono state identificate nel 12,3% dei pazienti, suggerendo che circa un bambino su otto con B-ALL presenti una predisposizione genetica sottostante. I geni maggiormente coinvolti sono risultati CHEK2, ATM, FANCA, ERCC3 e SBDS, principalmente associati ai meccanismi di riparo del DNA e controllo del ciclo cellulare. L'analisi di arricchimento ha evidenziato un significativo coinvolgimento di CHEK2 e dei pathway correlati alla risposta al danno del DNA, alla regolazione di TP53 e al checkpoint G1/S del ciclo cellulare. Dal punto di vista clinico, i pazienti portatori di tali varianti hanno mostrato una minore riduzione della malattia minima residua (MRD) durante l'induzione terapeutica e una maggiore frequenza di recidive a livello del sistema nervoso centrale.

Questi risultati suggeriscono un ruolo rilevante della predisposizione germinale nella patogenesi della B-ALL e indicano possibili applicazioni nella stratificazione del rischio, nella consulenza genetica e nello sviluppo di strategie terapeutiche personalizzate.

D. Analisi delle varianti di TP53 in LAL ipodiploide pediatrica (Project Leader Laura Bettini, MD, PhD).

D.1. La LAL ipodiploide è frequentemente associata a varianti di TP53, la maggior parte delle quali sono germline, suggerendo che la LA 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 LA 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. È in corso lo studio prospettico dei casi AIEOP LAL con ipodiploidia per successiva consulenza familiare.

(Bettini L. et al. Manuscript in preparation)

Abbiamo attivamente partecipato a due studi internazionali per i) identificare l'insorgenza di secondi tumori e capire l'incidenza dei diversi regimi di condizionamento, ii) uno studio su pazienti trattati con diversi regimi chemioterapici e CAR (coordinato da F. Ceppi, Losanna, CH)

D.2. *Studio Internazionale Li-Fraumeni:* Lo studio ha analizzato le caratteristiche cliniche e gli esiti terapeutici di 60 pazienti pediatrici con leucemia linfoblastica acuta a cellule B (B-ALL) associata a sindrome di Li-Fraumeni (LFS), una condizione ereditaria causata da varianti germinali del gene TP53. I risultati hanno evidenziato una prognosi significativamente peggiore rispetto alla popolazione generale affetta da ALL pediatrica, con una sopravvivenza libera da eventi (EFS) a 5 anni del 32,2% e una sopravvivenza globale (OS) del 69,3%. Le principali cause di fallimento terapeutico sono risultate essere la recidiva della leucemia e lo sviluppo di seconde neoplasie maligne (SMN), con incidenze cumulative a 5 anni rispettivamente del 37,6% e 34,1%. La maggior parte dei pazienti presentava una forma low-hypodiploid o masked hypodiploid, associata a elevato rischio

biologico. Lo studio suggerisce che approcci terapeutici meno genotossici, come le immunoterapie basate su blinatumomab e CAR T-cell, possano rappresentare strategie promettenti per ridurre la tossicità a lungo termine e migliorare il controllo della malattia in questa popolazione ad alto rischio.

(Ron Rabinowicz et al. Manuscript submitted for publication)

D.3. Studio: ruolo dell'immunoterapia nel trattamento della B-ALL ipodiploide e impatto delle mutazioni di TP53 sugli esiti clinici. Lo studio proposto ha l'obiettivo di valutare il ruolo dell'immunoterapia nel trattamento della leucemia linfoblastica acuta a cellule B ipodiploide (Hypodiploid B-ALL) e di analizzare l'impatto delle mutazioni del gene TP53 sugli esiti clinici. La B-ALL ipodiploide rappresenta un sottotipo raro ad alto rischio, caratterizzato da prognosi sfavorevole e frequente associazione con alterazioni germinali di TP53. Nonostante l'introduzione di nuove strategie immunoterapiche, come blinatumomab, inotuzumab e CAR-T, i dati disponibili sull'efficacia di questi trattamenti in questa specifica popolazione restano limitati. Lo studio raccoglierà dati clinici dettagliati relativi alle caratteristiche biologiche della malattia, alla risposta terapeutica, alla malattia minima residua (MRD), al trapianto di cellule staminali ematopoietiche (HCT) e agli outcome clinici, con l'obiettivo di definire il ruolo delle nuove immunoterapie e identificare fattori prognostici utili per strategie terapeutiche più personalizzate.

(coordinato da Spencer Mangum e Mike Pulsipher, University of Utah. Partecipanti: Balduzzi, Cazzaniga, Bettini)

E. Mutazioni nei geni delle coesine: varianti somatiche e ruolo nella predisposizione genetica alla LAL pediatrica (Project Leader: Grazia Fazio; Post Doc S.Rebellato, [M.Sc. D. Gaspari](#); PhD St. Silvia Rasetti)

E.1. Varianti germinali dei geni delle coesine e ruolo nella predisposizione genetica alla LAL pediatrica. (S.Rebellato, S.Rasetti) Abbiamo sviluppato un pannello personalizzato di sequenziamento di nuova generazione (NGS) mirato a geni di predisposizione e patogenetici, che abbiamo applicato su 120 campioni di pazienti pediatrici con LLA, identificando 11 varianti su 229 totali – 10 germinali e 1 somatica – nei geni delle coesine. I dati relativi a 205 tumori cerebrali sono stati estratti tramite analisi bioinformatica da database open-source, rilevando 19 varianti somatiche. In una coorte di 54 pazienti CdLSp, la più ampia proveniente da un singolo centro, con età mediana di 13 anni, l'ipotesi di una maggiore prevalenza di tumori nella CdLSp non è stata confermata. I nostri risultati evidenziano un coinvolgimento significativo delle varianti germinali di NIPBL nella CdLSp, mentre RAD21 e STAG1/2 si riscontrano prevalentemente come varianti somatiche nelle neoplasie. Tuttavia, non è stato identificato un pattern genetico o molecolare distinto che differenzi le varianti responsabili della CdLSp da quelle associate ai tumori.

Rigotti L,*Rebellato S,* Lettieri A,* ... Cazzaniga G,[^] Selicorni A.[^] Cohesins: Crossroad Between Cornelia de Lange Spectrum and Cancer Predisposition. Am J MedGenet A. 2025 Apr5:e64076. PMID: 40186517

Stiamo ora sviluppando l'analisi di metilazione per verificare l'impatto di fattori epigenetici.

(Abstract per Congressi AIEOP, SIES, SIGU, AIFET, SIOPE)

E.2. Fusioni somatiche di geni delle coesine in LAL pediatrica (Domenico Gaspari, Stefano Rebellato)

Lo studio ha investigato il possibile coinvolgimento dei geni del complesso delle coesine nella patogenesi della leucemia linfoblastica acuta (LLA) pediatrica, attraverso analisi trascrittomiche RNA-seq eseguite su 711 diagnosi e 138 recidive di LLA pediatrica B/T. L'analisi ha identificato trascritti di fusione coinvolgenti i geni STAG1, STAG2 e NIPBL nello 0,7% di pazienti, suggerendo l'esistenza di un possibile nuovo sottogruppo

molecolare di LLA. Le fusioni individuate sono state confermate mediante RT-PCR, sequenziamento Sanger e, in casi selezionati, tramite FISH, dimostrandone la specificità per la malattia. È stata inoltre osservata una possibile associazione con la traslocazione t(12;21)/ETV6::RUNX1, presente in diversi casi con alterazioni di STAG2. I risultati preliminari suggeriscono che i riarrangiamenti dei geni delle coesine possano contribuire ai meccanismi di leucemogenesi attraverso differenti modalità biologiche e rappresentare potenziali nuovi marcatori molecolari meritevoli di ulteriori studi funzionali.

(Abstract per Congressi AIEOP, SIES, SIGU, AIFET, SIOPE)

L'Unità di Genetica della Leucemia, diretta dal Dr. Cazzaniga è composta da 3 Project Leader (M. Bardini, G. Fazio, C. Palmi), 5 Post Doc (M. Bertagna, M. Quadri (fino a Febbraio 2025), L. Valsecchi, D. Acunzo, S. Rebellato), 5 PhD student (S. Procopio, N. Peccatori, A. Curto, R. Rapisarda, S. Rasetti), 1 borsista (Domenico Gaspari), 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 (R&D Project Leader 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 all' anno (Interfant), e per la LAL Ph+ (EsPhALL). Complessivamente in termini di attività, presso le unità di Biologia Molecolare e di Citogenetica del Centro Ricerca Tettamanti di Monza vengono riferiti il materiale per le analisi ed i dati dei 400 bambini ed adolescenti affetti da leucemia acuta linfoblastica in Italia e oltre il 10% direttamente per le cure.

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

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

Identificazione di alterazioni prognostiche e target terapeutici nelle LAL pediatriche (Project Leader: 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 leucemia. 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 l'analisi del trascrittoma (nota anche come RNA-seq o WTS=Whole Transcriptome Sequencing) a sostituzione del precedente pannello diagnostico, che consente di identificare qualsiasi gene di fusione, inclusi i riarrangiamenti complessi coinvolgenti i geni delle IgH, 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 1500 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 19 : 3 nel Settore Morfologia/Immunofenotipo, 12 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 Dr. 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 (*Project Leader Giovanni Cazzaniga*)

- Fusioni geniche in pazienti Infant con KMT2A wild type: caratterizzazione e outcome. In corso la raccolta dati di più di 200 casi, pubblicazione per fine anno 2025.

- Fusioni geniche che coinvolgono il gene PAX5: caratterizzazione e outcome. Riproposizione al nuovo meeting di Dicembre 2025, alla luce dei nuovi risultati (*vedi capitolo PAX5*)

- Fusioni dei geni delle coesine in ALL: caratterizzazione e outcome. Finalizzazione del primo lavoro di caratterizzazione, per poi riproporlo a PdL.
- Varianti di TP53 in ALL ipodiploide: impatto su trapianto, chemioterapia e seconde neoplasie. Collaborazione con gruppo Canadese.

Pubblicazioni scientifiche Unità Cazzaniga 2025

1. Caye-Eude A, Fazio G, Pastorczak A, Boer JM, Steinemann D, Ganguli D, Sonneveld E, Haslinger S, D'Andrea L, Bradtke J, Lopes BA, Zaliava M, Escherich G, König M, Fortschegger K, Inthal A, Stasevich I, Emerenciano M, Trka J, Castillo L, Parihar M, Moorman AV, Bergmann AK, den Boer ML, Mlynarski W, Cazzaniga G, Cavé H, Nebral K, Schinnerl D, Strehl S. PAX5::AUTS2 childhood B-ALL: a relapse-prone genetic subtype with frequent central nervous system involvement and a poor outcome. *Leukemia*. 2025 Feb;39(2):482-486. doi: 10.1038/s41375-024-02502-5. Epub 2024 Dec 19. PMID: 39702796
2. Lussana F, Magnani CF, Galimberti S, Gritti G, Gaipa G, Belotti D, Cabiati B, Napolitano S, Ferrari S, Moretti A, Buracchi C, Borleri GM, Rambaldi B, Rizzuto G, Grassi A, Paganessi M, Meli C, Tettamanti S, Risca G, Pais G, Spinozzi G, Benedicenti F, Cazzaniga G, Capelli C, Gotti E, Introna M, Golay J, Montini E, Balduzzi A, Valsecchi MG, Dastoli G, Rambaldi A, Biondi A. Donor-derived CARCIK-CD19 cells engineered with Sleeping Beauty transposon in acute lymphoblastic leukemia relapsed after allogeneic transplantation. *Blood Cancer J*. 2025 Apr 3;15(1):54. doi: 10.1038/s41408-025-01260-6. PMID: 40180925
3. Rigotti L, Rebellato S, Lettieri A, Castiglioni S, Mariani M, Totaro S, Saitta C, Gervasini C, Fazio G, Massa V, Cazzaniga G,* Selicorni A.* Cohesins: Crossroad Between Cornelia de Lange Spectrum and Cancer Predisposition. *Am J Med Genet A*. 2025 Apr 5:e64076. doi: 10.1002/ajmg.a.64076. PMID: 40186517 (*co-last)
4. Sangiorgio V, Mottadelli F, Pagni F, Cavalca F, Cazzaniga G, Venegoni M, Gambacorti-Passerini C, Piazza R, Maria Elli E. Next Generation Sequencing Identifies Subgroups of Patients With Triple Negative Primary Thrombocytosis With Different Clinical Thrombotic Outcomes. *Int J Lab Hematol*. 2025 Apr 7. doi: 10.1111/ijlh.14476. Online ahead of print. PMID: 40190073
5. Lucca C, Rosina E, Pezzani L, Piazzolla D, Spaccini L, Scatigno A, Gasperini S, Pezzoli L, Cereda A, Milani D, Cattaneo E, Cavallari U, Frigeni M, Marchetti D, Daolio C, Giordano L, Bellini M, Goisis L, Mongodi C, Tonduti D, Pilotta A, Cazzaniga G, Furlan F, Bedeschi MF, Mangili G, Bonanomi E, Iascone M. First-Tier Versus Last-Tier Trio Whole-Genome Sequencing for the Diagnosis of Pediatric-Onset Rare Diseases. *Clin Genet*. 2025 Apr 24. doi: 10.1111/cge.14760. Online ahead of print. PMID: 40274276
6. Stoltze U, Junk SV, Byrjalsen A, Cavé H, Cazzaniga G, Elitzur S, Fronkova E, Hjalgrim LL, Kuiper RP, Lundgren L, Mescher M, Mikkelsen T, Pastorczak A, Strullu M, Trka J, Wadt K, Izraeli S, Borkhardt A, Schmiegelow K. Overt and covert genetic causes of pediatric acute lymphoblastic leukemia. *Leukemia*. 2025 Mar 24. doi: 10.1038/s41375-025-02535-4. PMID: 40128563 (Review)
7. de Barrios O, Ocón-Gabarró I, Gusi-Vives M, Collazo O, Meler A, Romecín PA, Martínez-Moreno A, Tejedor JR, Fraga MF, Schneider P, Bardini M, Cazzaniga G, Marschalek R, Stam RW, Bueno C, Menéndez P, Parra M. HDAC7 induction combined with standard-of-care chemotherapy provides a therapeutic advantage in t(4;11) infant B-cell acute lymphoblastic leukemia. *Biomark Res*. 2025 Jul 28;13(1):99. doi: 10.1186/s40364-025-00810-1. PMID: 40722046

8. Junk, S. V., Bettini, L. R., Daus, K., Mescher, M., Jongmans, M. C. J., Borkhardt, A., Cazzaniga, G., Kuiper, R. P., Bakhuizen, J. J..A multi-dimensional approach to recognize genetic predisposition in children with acute lymphoblastic leukemia.EJC Paediatric Oncology. *Invited review*
9. Peccatori N, Brivio E, Lissat A, Bautista Sirvent F, Salzer E, Biondi A, Fazio G, Rizzari C, Tasian SK, Zwaan CM. Molecularly Targeted Small Molecule Inhibitor Therapy for Pediatric Acute Lymphoblastic Leukemia: A Comprehensive Review of Clinical Trials. *Cancers (Basel)*. 2025 Oct 15;17(20):3322. doi: 10.3390/cancers17203322. PMID: 41154380
- 10.Sindoni MM, Toso A, Limido F, Bugarin C, Villa T, Bonte S, Saeys Y, Buracchi C, Prunotto G, Meda Spaccamela V, Hauri M, Maglia O, Sala S, Gaspari D, Fazio G, Biondi A, Balduzzi A, Nucera S, Gaipa G. Impact of ATLG on CD4+ T-cell reconstitution after HSCT in children: a detailed immune profiling study. *Cytotherapy*. 2025 Oct;27(10):1208-1218. doi: 10.1016/j.jcyt.2025.06.009. Epub 2025 Jun 27.PMID: 40668172
- 11.Di Fede E, Taci E, Castiglioni S, Rebellato S, Ancona S, Grazioli P, Parodi C, Colombo EA, Bernardelli C, Lesma E, Krantz ID, Corti S, Priori A, Fazio G, Gervasini C, Massa V, Lettieri A. p300 inhibition delays premature cellular senescence. *NPJ Aging*. 2025 Jul 10;11(1):62. doi: 10.1038/s41514-025-00251-y.PMID: 40640194
- 12.Vendemini F, Roncareggi S, L'Imperio V, Guerra F, Mottadelli F, Chiarini M, Maglia O, Sala S, Fazio G, Piazza R, Bonanomi S, Biondi A, Saettini F. Bone Marrow CD8+Abundance Inversely Correlates with Progressive Marrow Fibrosis and Myelodysplastic Evolution in GATA2 Deficiency: Case Report. *J Clin Immunol*. 2025 Feb 20;45(1):77. doi: 10.1007/s10875-025-01871-5.PMID: 39976744

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

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

Una delle principali criticità associate all'impiego di cellule CAR-T anti-CD19 nel trattamento delle neoplasie linfoidi B è rappresentata dall'insorgenza di recidive caratterizzate dalla perdita o dalla ridotta espressione dell'antigene CD19 (recidive CD19-negative), che compromettono significativamente l'efficacia terapeutica a lungo termine. In questo scenario, il nostro gruppo di ricerca è impegnato nell'identificazione e validazione di nuovi antigeni target specifici per la leucemia linfoblastica acuta a cellule B (LLA-B). Attraverso attività di screening e caratterizzazione molecolare, sono stati individuati due potenziali target terapeutici, CD22 e BAFF-R, entrambi espressi in maniera rilevante sulle cellule leucemiche B. Successivamente, sono stati sviluppati costrutti CAR specifici per ciascun antigene e valutati in modelli preclinici in vitro e in vivo, evidenziando risultati consistenti in termini di attività citotossica ed efficacia antitumorale. Sulla base di questi dati, è stato quindi esplorato un approccio di targeting multiplo volto a ridurre il rischio di escape antigenico. In particolare, è stata implementata una strategia di co-elettroporazione, che consente la generazione di un prodotto cellulare CAR-T eterogeneo, costituito da sottopopolazioni di cellule esprimenti singolarmente il CAR anti-CD22 o anti-BAFF-R, nonché da una quota di cellule co-esprimenti entrambi i recettori chimerici. Le cellule ottenute mediante co-elettroporazione hanno dimostrato, nei saggi in vitro, un'elevata attività antitumorale, mostrando un vantaggio funzionale rispetto ai prodotti monospecifici diretti contro CD22 o BAFF-R. Gli studi di efficacia in vivo sono attualmente in corso e forniranno ulteriori evidenze sulla potenziale superiorità di questo approccio multi-targeting.

Il lavoro relativo al progetto di dottorato del dott. Alex Moretti è stato completato e il manoscritto è attualmente sottoposto a valutazione presso una rivista scientifica internazionale.

2. CARCIK anti-CD79b armate con IL-18: un'alternativa non virale al targeting del CD19 nelle leucemie e nei linfomi a cellule B refrattari/recidivanti

La perdita di espressione di CD19 rappresenta un meccanismo di resistenza rilevante, osservato fino al 45% dei pazienti con neoplasie B recidivanti/refrattarie (R/R) trattati con CAR-T anti-CD19. In questo contesto, CD79b emerge come un target alternativo promettente, grazie alla sua espressione stabile sulle cellule tumorali. Abbiamo pertanto sviluppato un CAR "armored" anti-CD79b, ingegnerizzato per secernere IL-18 al fine di potenziare l'attività antitumorale e modulare il microambiente tumorale. Utilizzando la piattaforma non virale Sleeping Beauty, cellule CIK sono state modificate con costrutti anti-CD79b e anti-CD79b-IL18 e confrontate in vitro con analoghi anti-CD19. Nei saggi di stimolazione tumorale cronica, le cellule CD79b_IL18.CARCIK hanno dimostrato un controllo tumorale completo, superiore rispetto a cellule CIK non modificate e a prodotti CARCIK monospecifici anti-CD19 e anti-CD79b. Tali cellule si sono inoltre dimostrate efficaci nell'eliminazione di cellule DAUDI con down-regolazione di CD19 e hanno evidenziato una marcata attività citotossica su campioni primari di LLA-B. Studi preliminari in vivo in modello DAUDI su topi NSG indicano un significativo controllo della crescita tumorale e un prolungamento della sopravvivenza. Complessivamente, il targeting di CD79b mediante CARCIK, ulteriormente potenziato dall'espressione di IL-18, rappresenta una strategia promettente per superare la

perdita di CD19 nei tumori B-cellulari R/R. Il progetto di dottorato della dott.ssa Beatrice Landoni si concluderà entro il 2026 con la sottomissione del manoscritto a una rivista scientifica internazionale.

Tutor: Dr.ssa Sarah Tettamanti.

3. Cellule CARCIK per il targeting delle neoplasie ematologiche CD7+

La terapia con cellule T ingegnerizzate con recettore chimerico per l'antigene (CAR-T) ha profondamente rivoluzionato il trattamento delle leucemie linfoblastiche acute (ALL) di origine B. Tuttavia, l'applicazione di questa strategia nelle leucemie T (T-ALL) risulta limitata dall'espressione condivisa dell'antigene CD7 sulle cellule leucemiche e sulle cellule T normali, determinando un fenomeno di fratricidio che riduce l'espansione e la persistenza delle cellule effettrici. Per superare tale criticità, il gruppo guidato dal Prof. Dario Campana ha sviluppato un approccio basato sull'impiego di un protein expression blocker (PEBL) anti-CD7, in grado di inibire l'espressione di CD7 sulla superficie cellulare, prevenendo il fratricidio senza alterare in modo significativo proliferazione e funzionalità delle cellule T. L'utilizzo del PEBL ha dimostrato, in precedenti studi, di migliorare la produzione e l'efficacia delle CAR-T anti-CD7 in ambito preclinico e clinico.

Sulla base di questo razionale, mediante piattaforma non virale trasposone/trasposasi Sleeping Beauty, sono state generate cellule CARCIK ingegnerizzate per esprimere PEBL da solo, CAR anti-CD7 da solo, oppure la combinazione PEBL+CD7.CAR. In un set di donatori (n=6), le cellule CD7 PEBL.CARCIK (rapporto trasposone/trasposasi 15/05) hanno mostrato un'elevata efficienza di ingegnerizzazione, con espressione del CAR >60% al giorno 7 e ~80% al giorno 14, associata a una marcata riduzione dell'espressione di CD7 (~25% al giorno 7 e ~1% al giorno 14). I saggi funzionali in vitro condotti contro la linea leucemica T-ALL Loucy hanno evidenziato un'elevata attività citotossica rispetto ai controlli, con percentuali di killing pari a ~70% a 4 ore (E:T 5:1) e ~90% a 24 ore (E:T 1:1). Complessivamente, gli esperimenti in vitro sono stati completati e hanno dimostrato la fattibilità, l'efficacia e la persistenza delle cellule CD7 PEBL.CARCIK; sono attualmente in corso studi preclinici in vivo in modelli murini per la valutazione dell'attività antitumorale e della durata della risposta.

Progetto di tirocinio in specialità di pediatria di Martina Paredi, junior tutor: Beatrice Landoni; senior Tutor: Alex Moretti.

4. Sviluppo e caratterizzazione preclinica di cellule CIK allogene non virali CARCIK-CD123/33 per il trattamento della leucemia mieloide acuta

Il progetto è finalizzato allo sviluppo di un nuovo prodotto cellulare allogeneico, denominato CARCIK-CD123/33, ottenuto mediante ingegnerizzazione non virale (sistema Sleeping Beauty) di cellule CIK con recettori chimerici diretti simultaneamente contro gli antigeni CD123 e CD33, espressi nelle cellule di leucemia mieloide acuta (LMA).

La fase preclinica ha dimostrato un'elevata attività antitumorale in vitro, caratterizzata da efficiente eliminazione di linee cellulari di LMA, produzione di citochine antigene-specifiche e mantenimento della capacità proliferativa in condizioni di stimolazione cronica. Analogamente, gli studi in vivo in modelli murini xenotrasplantati con cellule LMA CD123+/CD33+ hanno evidenziato un buon profilo di tollerabilità e un efficace controllo della malattia, in assenza di tossicità significativa.

Sulla base di tali evidenze, l'intero percorso preclinico è stato completato e trasferito con successo in condizioni di produzione GMP su larga scala. In particolare, sono stati eseguiti con successo tutti i run di validazione del processo produttivo del prodotto cellulare CARCIK-CD123/33 presso le Cell Factory GMP dell'ospedale IRCCS San Gerardo (Cell Factory "Verri", Monza) e dell'ASST Papa Giovanni XXIII (Cell Factory "Lanzani", Bergamo), confermando la robustezza, riproducibilità e trasferibilità del processo produttivo in ambiente conforme agli standard regolatori per applicazione clinica.

Contestualmente, sono stati sviluppati, ottimizzati e convalidati tutti i metodi analitici necessari per il controllo qualità, la caratterizzazione e il rilascio clinico del prodotto, in accordo con i requisiti regolatori vigenti per i medicinali di terapia avanzata (ATMP). Il costrutto CAR è stato inoltre ulteriormente ottimizzato mediante l'integrazione di un dominio anti-CD123 di nuova generazione, sviluppato in collaborazione con l'Università degli Studi di Perugia, contribuendo a migliorare le caratteristiche funzionali e la qualità del prodotto finale.

Il dossier regolatorio (Investigational Medicinal Product Dossier, IMPD), comprensivo del protocollo clinico, è attualmente in fase di assessment presso CTIS (Clinical Trials Information System) e AIFA, nell'ambito della procedura autorizzativa per l'avvio della sperimentazione clinica. L'obiettivo è l'attivazione di uno studio clinico di fase I entro il 2026, volto a valutare sicurezza, fattibilità ed efficacia preliminare del prodotto CARCIK-CD123/33 in pazienti adulti e pediatrici affetti da LMA recidivata o refrattaria, privi di opzioni terapeutiche curative.

Project Leader: Dr.ssa Sarah Tettamanti.

5. Caratterizzazione genotipica, metabolica e immunofenotipica della leucemia linfoblastica acuta (LLA) da precursori delle cellule T precoci (ETP) per lo sviluppo preclinico di cellule CAR-T

La leucemia linfoblastica acuta a cellule T a precursori precoci (ETP-ALL) è caratterizzata da un'espansione incontrollata di cellule T immature e da un profilo di espressione genica distintivo. I casi refrattari e le recidive sono verosimilmente associati a un inefficace targeting delle cellule iniziatrici della leucemia (LICs), note per la loro intrinseca resistenza ai trattamenti chemioterapici convenzionali. Evidenze preliminari indicano che i sottogruppi cellulari arricchiti in LIC nella T-ALL sono regolati da circuiti del ritmo circadiano, in grado di modulare, tra gli altri, i livelli di espressione del recettore dell'interleuchina 20 (IL20R). In questo contesto, il progetto si propone di caratterizzare in maniera integrata il profilo genotipico, metabolico e immunofenotipico dell'ETP-ALL al fine di identificare target cellulari specifici associati ai subset arricchiti in LIC e sviluppare strategie di immunoterapia cellulare basate su CAR. Gli obiettivi principali includono: (1) l'identificazione di bersagli cellulari regolati dai circuiti circadiani e associati all'attività delle LIC in ETP-ALL; (2) la caratterizzazione metabolica, con particolare attenzione al metabolismo degli aminoacidi a catena ramificata (BCAA); (3) la generazione e validazione di cellule CAR dirette contro antigeni espressi selettivamente dalle cellule leucemiche. Il disegno sperimentale prevede l'analisi dell'eterogeneità cellulare mediante approcci di single-cell RNA sequencing (scRNA-seq) e citometria a flusso multiparametrica, al fine di determinare la presenza di sottocloni immunofenotipici ricorrenti nei pazienti con ETP-ALL e il loro arricchimento in attività LIC, nonché la correlazione con specifiche alterazioni genetiche. Le librerie fagiche esprimenti frammenti variabili a catena singola (scFv) saranno utilizzate per la generazione di costrutti CAR basati su sistema trasposone, diretti contro i marcatori di superficie identificati. A scopo di proof-of-concept, sono stati clonati i costrutti CAR-CD33 e CAR-

CD117 (c-Kit), attualmente trasdotti in cellule CIK, e sono in corso esperimenti funzionali in vitro per la valutazione dell'attività di targeting e citotossicità. Sulla base di questi risultati, verranno sviluppate e validate cellule CARCIK da testare per efficacia e sicurezza in modelli preclinici in vitro e in vivo, anche in combinazione con le attuali terapie chemioterapiche. Questa attività sarà svolta presso il Centro Tettamanti.

PI: Giuseppe Gaipa; collaboratori scientifici: Sarah Tettamanti, Cristina Bugarin, Chiara Buracchi, Giusi Melita.
Progetto: PNRR: M6/C2_CALL 2023- Project Code:PNR-TR1-2023-12377419, to IRCCS San Gerardo dei Tintori.

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

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 che 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 più prolungato e sono tuttora sottomessi al team statistico della Prof.ssa Stefania Galimberti.

Responsabile principale del progetto: Chiara Buracchi, Il progetto è in collaborazione con la dottoressa Benedetta Rambaldi dell'Ospedale Papa Giovanni XXIII di BG.

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

Nell'ambito della collaborazione con il consorzio europeo EuroFlow, proseguono le attività di ricerca sulle LLA-B e LLA-T all'interno di specifici work packages, con il contributo attivo del nostro gruppo nello sviluppo e nella validazione di pannelli anticorpali per citometria a flusso avanzata.

Per la LLA-B, è stato validato un pannello a 12 parametri integrato con database di riferimento per l'analisi automatizzata e standardizzata della malattia minima residua (MRD), già oggetto di recente pubblicazione scientifica (Martijn W C Verbeek et al Hemasphere. 2025 Apr 13;9(4):e70125.doi: 10.1002/hem3.70125. eCollection 2025 Apr). Per la LLA-T, è stato sviluppato e validato un approccio NGF-MRD EuroFlow a 12 colori

in doppio tubo, in grado di garantire un'elevata sensibilità e standardizzazione del monitoraggio della MRD in coorti multicentriche pediatriche e adulte. Complessivamente, gli studi su LLA-B e LLA-T proseguono attivamente nell'ambito del consorzio EuroFlow, contribuendo allo sviluppo e armonizzazione di metodiche avanzate per la caratterizzazione immunofenotipica e il monitoraggio della MRD.

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

La leucemia linfoblastica acuta a cellule T (T-ALL) è una neoplasia aggressiva caratterizzata da marcata eterogeneità biologica e da una significativa incidenza di resistenza alla chemioterapia, con recidive in circa il 30% dei casi. Tale eterogeneità è sostenuta da alterazioni genetiche e dall'attivazione di specifiche vie di segnalazione coinvolte nella sopravvivenza e proliferazione cellulare, dinamicamente modulate sotto pressione terapeutica. L'integrazione di approcci multi-omici ad alta risoluzione (CyTOF, scDNA-seq, scRNA-seq) consente di identificare i determinanti molecolari della resistenza e nuove vulnerabilità terapeutiche. In questo contesto, è stata osservata la sovraespressione di biomarcatori associati al ciclo cellulare, in particolare CDK4/6, per i quali sono disponibili inibitori selettivi potenzialmente impiegabili in combinazione con farmaci chemioterapici standard (es. corticosteroidi). Studi funzionali in vitro sono attualmente in corso per valutare la sinergia terapeutica sia su cellule di malattia minima residua (MRD) sia su cellule di recidiva. Parallelamente, il progetto mira allo sviluppo di cellule CAR allogene basate su piattaforma CIK non virale, dirette contro antigeni di superficie della T-ALL. L'integrazione tra targeting immunoterapico e modulazione farmacologica delle vie intracellulari rappresenta un approccio promettente per migliorare la stratificazione dei pazienti ad alto rischio e sviluppare strategie di medicina di precisione nella T-ALL recidivante/refrattaria.

PI: Giuseppe Gaipa

9. Studio dell'immunoricostituzione dopo trapianto allogenico di cellule staminali ematopoietiche per leucemia linfoblastica acuta

L'immunoricostituzione rappresenta un determinante prognostico chiave nei pazienti sottoposti a trapianto allogenico di cellule staminali emopoietiche (HSCT), in particolare in ambito onco-ematologico. Utilizzando metodiche citofluorimetriche altamente standardizzate e sensibili, sviluppate nell'ambito del consorzio EuroFlow, di cui il nostro Centro è parte attiva, abbiamo analizzato il processo di immunoricostituzione in una coorte di 30 pazienti sottoposti a HSCT per leucemia linfoblastica acuta (LLA). La piattaforma consente una caratterizzazione dettagliata dei subset linfocitari, con particolare riferimento ai compartimenti T e B. Per l'analisi di dataset complessi e ad elevata dimensionalità, è stata implementata una pipeline bioinformatica basata su algoritmo FlowSOM (Dott. Marco Sindoni), in grado di supportare un'analisi non supervisionata e riproducibile dei dati citofluorimetrici. Il nostro Centro ha inoltre contribuito alla validazione della ripetibilità inter-laboratorio delle analisi, dimostrando un'elevata concordanza tra diversi centri europei anche mediante comparazione tra piattaforme citofluorimetriche differenti. Parallelamente, è stato ottenuto un finanziamento EuroFlow per lo sviluppo di un pannello anticorpale innovativo nel contesto di uno studio multicentrico sull'immunoricostituzione post-HSCT in pazienti pediatriche con LLA. Lo studio, coordinato dalla Fondazione

Tettamanti (Responsabile: Silvia Nucera), coinvolgerà 10 centri europei ed è finalizzato alla standardizzazione e armonizzazione delle analisi immunofenotipiche avanzate in questo setting clinico.

10. 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 è finalizzato allo sviluppo di cellule CARCIK-CD19 derivate da sangue cordonale (CB, cord blood) come fonte allogenica immediatamente disponibile ("third-party, off-the-shelf") per il trattamento di pazienti affetti da leucemia linfoblastica acuta. L'utilizzo del sangue cordonale rappresenta un vantaggio strategico rilevante, in quanto consente l'accesso a un prodotto cellulare prontamente disponibile, standardizzabile e indipendente dal paziente, riducendo i tempi di produzione e garantendo un'elevata qualità biologica del materiale di partenza. Il progetto si articola in due principali direttrici: i) attività precliniche volte a dimostrare la fattibilità della generazione di cellule CARCIK-CD19 a partire da unità di sangue cordonale crioconservato, nonché la loro caratterizzazione funzionale mediante saggi in vitro e in vivo; ii) sviluppo e ottimizzazione del processo produttivo in condizioni di Good Manufacturing Practice (GMP) per la generazione di un prodotto clinicamente utilizzabile. In questo contesto, è stata dimostrata la piena fattibilità e robustezza della piattaforma, con validazione della scalabilità del processo produttivo in ambiente GMP per la produzione di lotti clinici di cellule CARCIK-CD19. Tali risultati supportano l'applicabilità del sistema in un contesto traslazionale e clinico. Parallelamente, è in fase di preparazione il manoscritto scientifico che descrive i risultati preclinici e di sviluppo tecnologico del progetto, con l'obiettivo di contribuire alla diffusione e validazione della piattaforma "off-the-shelf" nel trattamento delle neoplasie linfoproliferative B.

L'Unità diretta dal Dottor Giuseppe 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; Dottoressa Silvia Nucera, Medico, ricercatore specialista in pediatria; Dottor Alex Moretti, Medico, ricercatore post-doc; Dottor Marco Sindoni, biotecnologo, PhD student; Dottoressa Beatrice Landoni, biotecnologa, PhD student, dott.ssa Anita Toso, Biotecnologa, PhD student; Dottoressa Jessica Merulla, assistente di ricerca. Pubblicazioni da gennaio 2022 a maggio 2026:

Pubblicazioni 2025

1. Ponzo M, Druifuca L, Buracchi C, Sindoni MM, Nucera S, Bugarin C, Bason R, Rossetti G, Bonnal R, Meli C, Rambaldi B, Lussana F, Ferrari S, Moretti A, Dastoli G, Risca G, Pellegrino C, Manz MG, Galimberti S, Rambaldi A, Gaipa G, Biondi A, Pagani M, Magnani CF. Acquisition of an immunosuppressive microenvironment after anti-CD19 CAR T-cell therapy is associated with T-cell dysfunction and resistance. *J Immunother Cancer*. 2025 Oct 23;13(10):e011768. doi: 10.1136/jitc-2025-011768.
2. Verbeek MWC, Reiterová M, Laqua A, Rodríguez BS, Sedek L, Buracchi C, Buysse M, Oliveira E, Engelmann R, Desterro J, De Jong AX, Boettcher S, Jugooa R, Barrena S, Kohlscheen S, Nierkens S, Rodrigues JG, Hofmans

- M, Gaipa G, Sobral de Costa E, Mejstrikova E, Szczepanski T, Brüggemann M, van Dongen JJM, Orfao A, van der Velden VHJ. Minimal residual disease assessment following CD19-targeted therapy in B-cell precursor acute lymphoblastic leukemia using standardized 12-color flow cytometry: A EuroFlow study. *Hemasphere*. 2025 Apr 13;9(4):e70125. doi: 10.1002/hem3.70125. eCollection 2025 Apr. PMID: 4022416
3. Mancabelli L, Palomba E, Magni F, Chatenoud L, Olgiati I, Buracchi C, Bugarin C, Gaipa G, Abbruzzese C, Filippini M, Forastieri A, Fumagalli R, Geraldini F, Picetti E, Terranova L, Vaschetto R, Zoerle T, Ventura M, Citerio G, Gori A, Bandera A, Alagna L, Turrone F. Microbial signatures and host immune responses associated with the development of ventilator-associated pneumonia among patients with neurological injuries. *Microbiol Spectr*. 2026 Mar 23;14(5):e0319325. doi: 10.1128/spectrum.03193-25. Online ahead of print. PMID: 41869813
 4. Pisani I, Melita G, de Souza PB, Galimberti S, Savino AM, Sarno J, Landoni B, Crippa S, Gotti E, Cuofano C, Pedrini O, Capelli C, Matera G, Belotti D, Cesana S, Cabiati B, Quaroni M, Colombo V, Mazza M, Vergani B, Gaimari A, Nicolini F, Tazzari M, Bocchini M, Serafini M, Rambaldi A, Rambaldi B, Dastoli G, Biondi A, Gaipa G, Introna M, Golay J, Tettamanti S. Optimized GMP-grade production of non-viral Sleeping Beauty-generated CARCIK cells for enhanced fitness and clinical scalability. *J Transl Med*. 2025 May 19;23(1):559. doi: 10.1186/s12967-025-06416-3. PMID: 40390044
 5. Moretti A, Buracchi C, Napolitano S, Baldini V, Gaipa G, Biondi A, Balduzzi A. Chimeric antigen receptor therapy for hematological malignancies: a pediatric perspective from leukapheresis to infusion. *Blood Transfus*. 2025 Apr 16. doi: 10.2450/BloodTransfus.952. Online ahead of print. PMID: 40423590
 6. Sindoni MM, Limido F, Toso A, Lucchini G, Gaipa G, Balduzzi A, Nucera S. aGvHDtrackR and cGvHDtrackR: shiny applications for graft versus host disease management and clinical data collection. *Bone Marrow Transplant*. 2025 Mar;60(3):389-392. doi: 10.1038/s41409-025-02509-1. Epub 2025 Jan 9. PMID: 39789136
 7. Lussana F, Magnani CF, Galimberti S, Gritti G, Gaipa G, Belotti D, Cabiati B, Napolitano S, Ferrari S, Moretti A, Buracchi C, Borleri GM, Rambaldi B, Rizzuto G, Grassi A, Paganessi M, Meli C, Tettamanti S, Risca G, Pais G, Spinozzi G, Benedicenti F, Cazzaniga G, Capelli C, Gotti E, Introna M, Golay J, Montini E, Balduzzi A, Valsecchi MG, Dastoli G, Rambaldi A, Biondi A. Donor-derived CARCIK-CD19 cells engineered with Sleeping Beauty transposon in acute lymphoblastic leukemia relapsed after allogeneic transplantation. *Blood Cancer J*. 2025 Apr 3;15(1):54. doi: 10.1038/s41408-025-01260-6. PMID: 40180925 Free PMC article. *Clinical Trial*.
 8. Reiterová M, Kohlscheen S, Maglia O, Sala S, Schumich A, Maurer-Granofszky M, Faggin G, Scarparo P, Varotto E, Šestáková Z, Švec P, Feuerstein T, Vernitsky H, Kužílková D, Hrušák O, Buldini B, Dworzak M, Brüggemann M, Gaipa G, Kalina T; AIEOP-BFM ALL Flow group. Flow-cytometric MRD detection in pediatric T-ALL: a multicenter AIEOP-BFM consensus-based guided standardized approach. *Clin Chem Lab Med*. 2025 Mar 13;63(7):1419-1426. doi: 10.1515/cclm-2024-1503. Print 2025 Jun 26. PMID: 40068909

Unità di Ricerca 'Single-Cell Unit (Jolanda Sarno)

Unità di ricerca recentemente nata (Settembre 2023) che si occupa di sfruttare tecnologie ad alta risoluzione per studiare al livello della singola cellula le caratteristiche specifiche del tumore.

Progetti di ricerca

1. Studio multiomico della malattia residua minima in pazienti pediatrici con B-ALL (Riccardo Scribano, PhD student su AIRC Start-UP)

La leucemia linfoblastica acuta a cellule B (B-ALL) recidivante rimane una delle principali cause di morte correlata al cancro nei pazienti pediatrici. Nonostante l'identificazione della malattia residua minima (MRM) al termine della terapia di induzione abbia un forte potere prognostico, i meccanismi alla base della resistenza al trattamento nelle cellule MRD rimangono incompresi. Per prevenire la recidiva e migliorare la prognosi dei pazienti con B-ALL, il nostro studio mira a identificare e caratterizzare le popolazioni cellulari associate al fallimento terapeutico nelle sue fasi iniziali.

A tale scopo, abbiamo eseguito analisi a singola cellula su campioni longitudinali di pazienti pediatrici con B-ALL utilizzando un pannello CyTOF a 42 parametri. I campioni sono stati raccolti da 48 pazienti arruolati nello studio clinico AIEOP-BFM ALL 2009 (NCT01117441) alla diagnosi (Dx), in punti temporali precoci del trattamento (giorno 8, giorno 15) e alla recidiva (Rx).

I dati di proteomica sono stati integrati con dati di trascrittomica a singola cellula (scRNA-Seq) a fine di identificare pathways associati alla resistenza.

Risultati preliminari suggeriscono che i pazienti che vanno incontro alla recidiva di ricaduta, hanno già a timepoint precoci cellule pre B maggiormente rappresentate. Queste cellule risultano quiescenti e metabolicamente spinte verso l'ossidazione fosforilativa suggerendo che una nicchia metabolicamente protetta, possa favorire la sopravvivenza e il mantenimento di un pool di cellule pre B resistenti alla terapia, potenzialmente responsabili della successiva ricaduta.

I risultati di questa ricerca sono stati presentati con comunicazione orale ad ASH 2025, SIOPE 2026, AIEOP in LAB 2026 e CyTO 2026. (Finanziamento: AIRC START-UP Sarno Jolanda)

2. Studio della resistenza ai glucocorticoidi nella leucemia pediatrica: dalla plasticità fenotipica alla riprogrammazione metabolica. (Martina Basilico, borsista AIRC Start-UP)

La resistenza ai glucocorticoidi è associata a una scarsa risposta alla chemioterapia e maggior rischio di ricaduta, tuttavia non è ancora chiaro come le cellule resistenti ai glucocorticoidi acquisiscono caratteristiche che le rendono resistenti anche agli altri trattamenti farmacologici. Pertanto in questo progetto ci poniamo l'obiettivo di investigare la possibile connessione tra i cambiamenti fenotipici indotti dal trattamento con i glucocorticoidi e la loro rimodulazione metabolica.

A tale scopo abbiamo messo a punto un pannello metabolico per CyTOF che ci permette di studiare i cambiamenti metabolici a livello di singola cellula. L'analisi preliminare indica che le cellule sopravvivenenti

mantengono un metabolismo di tipo mitocondriale, con l'attivazione di specifici pathway quali GLUT-1 e G6PD, delineando un profilo metabolico adattativo orientato alla sopravvivenza in risposta al trattamento.

(Finanziamento: AIRC START-UP Sarno Jolanda)

3. Studio e targeting dell'asse CCR1/CCL5 nella leucemia mieloide acuta (Dr. Linda Bucciarelli, postdoc).

Questa linea di ricerca si inserisce nell'ambito di un progetto collaborativo con la Dr.ssa Simona Valetta dell'Università di Manchester (UK) ed è focalizzata sullo studio del cross talk tra la componente immunitaria e il tumore nell'ambito della leucemia mieloide acuta (LMA), una neoplasia dove la mortalità rimane elevata e la recidiva costituisce una sfida clinica ancora irrisolta. Storicamente, la recidiva è stata attribuita alle cellule staminali leucemiche che persistono dopo il trattamento grazie alla loro capacità di auto-rinnovamento. Le LSC creano un microambiente midollare immunosoppressivo in cui la risposta immunitaria risulta disregolata. La comprensione delle interazioni tra le cellule della LMA e le cellule immunitarie è fondamentale per identificare nuovi bersagli terapeutici e sviluppare nuovi approcci immunoterapeutici. Dati preliminari mostrano che il recettore CCR1 sia sovraespresso nella LMA murina e umana, evidenziando come la segnalazione di *Ccr1* faciliti la progressione della LMA in modelli murini, in parte attraverso l'interazione tra LSC e cellule immunitarie, che esprimono rispettivamente *Ccr1* e il ligando CCL5. Nel presente lavoro, caratterizzeremo dapprima il ruolo della segnalazione CCR1-CCL5 nella risposta immunitaria della LMA, per fornire successivamente una comprensione esaustiva del panorama immuno-biologico della malattia. In particolare, verrà indagato il ruolo dell'infiammazione e del rimodellamento metabolico nel favorire il microambiente immunosoppressivo della LMA. I risultati attesi forniranno nuove conoscenze sul microambiente immunosoppressivo della LMA, contribuendo all'identificazione di nuove interazioni tra cellule leucemiche e cellule immunitarie, indispensabili per guidare lo sviluppo di nuove strategie immunoterapeutiche.

(Finanziamento: EHA Bilateral Sarno Jolanda- Simona Valletta)

Collaborazioni internazionali

- Prof. Kara Davis, Stanford University, CA, USA.
- Dr. Renée Beekman, Center for Genomic Regulation (CRG), Barcellona, Spagna.
- Dr. Simona Valletta, University of Manchester, Manchester, UK.
- Dr. Federica Sodano, Università di Napoli Federico II, Napoli, Italia
- Dr. Carminia Della Corta, Università degli Studi della Campania Luigi Vanvitelli, Napoli, Italia.
- Dr. Kostas Stomatopoulos, Direttore dell'Istituto di Applied Biosciences at CERTH, Salonicco, Grecia.

Pubblicazioni 2025

1. Domizi P, Sarno J, Jager A, Merchant M, Pacheco KZB, Yamada-Hunter SA, Rotiroti MC, Liu Y, Baskar R, Reynolds WD, Swarder BJ, Sahaf B, Bendall SC, Mullighan CG, Alizadeh AA, Leahy AB, Myers RM, Yates B, Wang HW, Shah NN, Majzner RG, Mackall CL, Grupp SA, Barrett DM, Sotillo E, Davis KL. IKAROS levels are associated

with antigen escape in CD19- and CD22-targeted therapies for B-cell malignancies. *Nat Commun.* 2025 Apr 23;16(1):3800. doi: 10.1038/s41467-025-58868-2. PMID: 40268897; PMCID: PMC12019336.

2. Pisani I, Melita G, de Souza PB, Galimberti S, Savino AM, Sarno J, Landoni B, Crippa S, Gotti E, Cuofano C, Pedrini O, Capelli C, Matera G, Belotti D, Cesana S, Cabiati B, Quaroni M, Colombo V, Mazza M, Vergani B, Gaimari A, Nicolini F, Tazzari M, Bocchini M, Serafini M, Rambaldi A, Rambaldi B, Dastoli G, Biondi A, Gaipa G, Introna M, Golay J, Tettamanti S. Optimized GMP-grade production of non-viral Sleeping Beauty-generated CARCIK cells for enhanced fitness and clinical scalability. *J Transl Med.* 2025 May 19;23(1):559. doi: 10.1186/s12967-025-06416-3. PMID: 40390044; PMCID: PMC12087026.

3. Craig E, Keyes TJ, Sarno J, D'Silva JP, Domizi P, Zaslavsky M, Tsai A, Glass D, Nolan GP, Hastie T, Tibshirani R, Davis KL. Annotation-free discovery of disease-relevant cells in single-cell datasets. *Sci Adv.* 2025 Aug 29;11(35):eadv5019. doi: 10.1126/sciadv.adv5019. Epub 2025 Aug 27. PMID: 40864714; PMCID: PMC12383263.

4. Riccardo Scribano, Adrian Delgado, Pablo Domizi, Chiara Buracchi, Astraea Jager, Tim Keyes, Cristina Bugarin, Giuseppe Gaipa, Kara Davis, Jolanda Sarno. Multi-omic analysis of early minimal residual disease identifies functional and transcriptomic signatures of treatment resistance in pediatric B-cell acute lymphoblastic leukemia. *Blood*, Volume 146, Supplement 1, 2025, Page 334, ISSN 0006-4971, <https://doi.org/10.1182/blood-2025-334>.

5. Liu Y, Jiang H, Liu J, Stuanil L, Merchant M, Jager A, Koladiya A, Chang TC, Domizi P, Sarno J, Wang A, Keyes T, Jedoui D, Meng J, Hartmann FJ, Hou R, Fries C, Pirillo C, Gao Q, Iacobucci I, Bendall SC, Huang M, Lacayo NJ, Sakamoto KM, Mullighan CG, Loh M, Yu J, Yang JJ, Ye J, Davis KL. DHODH as a targetable metabolic Achilles' heel for chemotherapy-resistant B-ALL. *Blood.* 2026 May 14;147(20):2328-2343. doi: 10.1182/blood.2025029264. PMID: 41576347.

Unità di Ricerca “Errori innati dell’immunità” (Francesco Saettini)

L’Unità di Ricerca “Errori innati dell’immunità” si occupa dello studio dei meccanismi attraverso cui l’alterazione della funzione immunitaria contribuisce allo sviluppo di infezioni, disregolazione immunitaria, citopenie e predisposizione a neoplasie ematologiche negli errori innati dell’immunità, un gruppo eterogeneo di patologie rare a base genetica.

L’attività dell’Unità integra ricerca clinica e traslazionale attraverso l’utilizzo di tecnologie avanzate, tra cui next-generation sequencing (NGS), single-cell RNA sequencing, citometria di massa a singola cellula (CyTOF), analisi metaboliche cellulari e modelli cellulari paziente-specifici.

Particolare interesse è rivolto ai meccanismi di immunosorveglianza, immunometabolismo e interazione tra sistema immunitario e compartimento ematopoietico nelle sindromi immunogenetiche associate a predisposizione mielodisplastica, leucemia e linfoproliferativa.

Progetti di ricerca

1. Studio dei meccanismi immunologici in GATA2 deficiency

GATA2 deficiency rappresenta una sindrome paradigmatica al confine tra immunologia ed ematologia, caratterizzata da suscettibilità infettiva, citopenie e marcata predisposizione a sindromi mielodisplastiche e leucemia mieloide acuta.

Nel 2022 è stato avviato il protocollo italiano multicentrico sulla GATA2 deficiency (PI Francesco Saettini), che comprende attualmente una delle più ampie coorti internazionali di pazienti pediatrici e adulti.

L’attività di ricerca è focalizzata su:

- studio della disfunzione immunitaria adattativa e dei meccanismi di immunosorveglianza;
- caratterizzazione fenotipica e funzionale dei linfociti T CD8+;
- studio dell’esaurimento immunologico e del metabolismo mitocondriale;
- analisi multiomiche del microbiota intestinale e del profilo metabolomico pre- e post-trapianto.

Il progetto si sviluppa attraverso collaborazioni nazionali e internazionali e ha già portato alla pubblicazione di lavori scientifici. I dati preliminari indicano alterazioni dei programmi immunometabolici e della funzione citotossica dei linfociti T CD8+, suggerendo un possibile ruolo del deficit di immunosorveglianza nella predisposizione alle neoplasie mieloidi. I risultati sono stati presentati con comunicazioni orali al congresso ESID/SIOPE/EHA 2025.

(Finanziamento: EJP-RD)

2. FNIP1 deficiency

L’Unità coordina studi clinici e biologici su FNIP1 deficiency, una immunodeficienza multisistemica estremamente rara identificata e caratterizzata dal gruppo nel 2021.

L'attività di ricerca mira a chiarire il ruolo della proteina FNIP1 nella regolazione dell'omeostasi immunitaria, del metabolismo cellulare e della funzione mitocondriale.

Le principali linee di studio comprendono:

- caratterizzazione immunologica dei difetti B-cellulari;
- studio della neutropenia e delle alterazioni mieloidi;
- analisi del coinvolgimento neurologico e polmonare;
- studio dei pathway immunometabolici e della funzione mitocondriale.

L'attività viene svolta attraverso una rete collaborativa internazionale che coinvolge gruppi di ricerca negli Stati Uniti, Australia, Germania e Italia.

(Finanziamento: Pharming, LFB)

3. Immunodeficienze sindromiche con fenotipo ematologico

Una linea di ricerca emergente è dedicata allo studio delle immunodeficienze sindromiche associate a predisposizione mielodisplastica, leucemica e linfoproliferativa, tra cui SAMD9/SAMD9L, DNAJC21 e altre sindromi da insufficienza midollare ereditaria.

L'obiettivo è comprendere come alterazioni della risposta immunitaria, dell'infiammazione cronica e dei meccanismi di immunosorveglianza contribuiscano all'evoluzione clonale e alla predisposizione neoplastica.

I progetti includono

- studio dell'ematopoiesi clonale negli errori innati dell'immunità;
- analisi del repertorio TCR/BCR;
- studio dell'esaurimento immunologico e metabolico dei linfociti T;
- integrazione di multiomiche e fenotipi immunologici;
- Identificazione e caratterizzazione di errori innati dell'immunità

L'Unità partecipa a studi nazionali e internazionali finalizzati all'identificazione di nuove immunodeficienze primitive e alla definizione delle correlazioni genotipo-fenotipo.

L'attività ha contribuito alla caratterizzazione di nuovi errori innati dell'immunità, tra cui:

- FNIP1 deficiency;
- PI4KA-related disorder;
- KARS1-related disorder.

I risultati ottenuti hanno contribuito all'inclusione di queste condizioni nella classificazione internazionale IUIS degli errori innati dell'immunità e all'ampliamento delle conoscenze sui meccanismi genetici della disregolazione immunitaria.

Collaborazioni internazionali: National Institute of Health, University of Washington, European Joint Programme on Rare Diseases

Pubblicazioni 2025

1. Fumagalli R, Saettini F. Expanding the Spectrum of Selective IgM Deficiency: From Infections to Immune Dysregulation. *Int J Mol Sci.* 2025 Sep 16;26(18):9003. doi: 10.3390/ijms26189003.
2. Roncareggi S, Iritani BM, Saettini F. FNIP1 Deficiency: Pathophysiology and Clinical Manifestations of a Rare Syndromic Primary Immunodeficiency. *Curr Issues Mol Biol.* 2025 Apr 18;47(4):290. doi: 10.3390/cimb47040290.
3. Di Majo BE, Leoni C, Cartisano E, Fossati C, Viscogliosi G, Trevisan V, Bruno LP, Conti F, Moratti M, Monaco E, Rigante D, Rivalta B, Cancrini C, Szczawińska-Popłonyk A, Jamsheer A, Obara-Moszyńska M, Zakharova V, Shcherbina A, Rodina J, Tüysüz B, Jamuar SS, Lim JY, Goh J, Cereda A, Agovino T, Contaldo I, Gambardella ML, Balduzzi AC, Cherubino A, Marrocco GA, Bellesi S, Carusi V, Rumi G, Biondi A, Zampino G, Saettini F. Cardiofaciocutaneous syndrome and immunodeficiency: data from an international multicenter cohort. *Front Immunol.* 2025 Jul 7;16:1598896. doi: 10.3389/fimmu.2025.1598896.
4. Di Majo BE, Guerra F, Mauri M, Coniglio ML, Sieni E, Parolini S, Tabellini G, Bugarin C, Dell'Acqua F, Lucchini G, Bonanomi S, Balduzzi AC, Mann J, Ehl S, Biondi A, Saettini F. The novel XIAP Lys396Ter variant alters mitochondrial membrane potential and endoplasmic reticulum intensity in monocytes of two XIAP-deficient patients. *Pediatr Hematol Oncol.* 2025 Aug;42(5):287-295. doi: 10.1080/08880018.2025.2521122.
5. Vendemini F, Roncareggi S, L'Imperio V, Guerra F, Mottadelli F, Chiarini M, Maglia O, Sala S, Fazio G, Piazza R, Bonanomi S, Biondi A, Saettini F. Bone Marrow CD8+ Abundance Inversely Correlates with Progressive Marrow Fibrosis and Myelodysplastic Evolution in GATA2 Deficiency: Case Report. *J Clin Immunol.* 2025 Feb 20;45(1):77. doi: 10.1007/s10875-025-01871-5.

Unità di Ricerca "Leukemia Metabolism" (Angela Maria Savino)

Unità di ricerca focalizzata sull'identificazione di vulnerabilità metaboliche nelle leucemie mieloidi acute e nelle leucemie linfoblastiche acute, sia nella nicchia midollare sia nei siti extramidollari, in relazione alla diversa disponibilità di nutrienti e alla risposta a terapie target.

Progetti on-going in laboratorio:

1) Impatto del metabolismo del fruttosio sulla leucemia mieloide acuta con mutazione di IDH2 (Martina Failla, PhD student)

Le recenti scoperte di mutazioni oncogeniche in geni del metabolismo e lo sviluppo di metodiche sempre più accurate per il profiling metabolico hanno riacceso l'interesse verso la progettazione razionale di terapie basate anche su interventi dietetici. La leucemia mieloide acuta (LMA) rappresenta la principale causa di morte per leucemia negli adulti, in particolare in caso di recidiva a livello midollare o in sedi extramidollari. Nei pazienti con LMA, le mutazioni di IDH1 e IDH2 sono presenti fino a circa il 20% dei casi. Nonostante la disponibilità di inibitori specifici di IDH1/2 approvati dalle agenzie regolatorie, meno del 40% dei pazienti con LMA mutata per IDH ottiene una risposta clinica, indicando che gli effetti metabolici di tali mutazioni sono complessi e ancora poco caratterizzati. Si ipotizza che il fruttosio si accumuli in modo anomalo nel midollo osseo leucemico rispetto ai soggetti sani. Tale accumulo potrebbe riprogrammare il metabolismo di zuccheri e lipidi nei pazienti leucemici esposti a fruttosio, svelando vulnerabilità metaboliche specifiche che rimangono "nascoste" quando sono disponibili altre fonti glucidiche. Razionale: Sulla base dei risultati preliminari che hanno evidenziato una up-regolazione della via di sintesi della serina (Serine Synthesis Pathway, SSP) nelle cellule di LMA esposte al fruttosio, l'attenzione verrà focalizzata su questa potenziale dipendenza metabolica nelle LMA con mutazioni di IDH1/2. Oltre alla serina, la SSP genera l' α -chetoglutarato (α -KG), metabolita essenziale e principale substrato delle forme mutate degli enzimi IDH. Un aumento del flusso attraverso la SSP favorisce inoltre il metabolismo della glutamina e la produzione di NADPH tramite il ciclo monocarbonioso (1C) mediato dai folati, cofattore cruciale per la reazione catalizzata dall'enzima mutato. Pertanto, si ipotizza che le cellule di LMA IDH1/2-mutate presentino una dipendenza aumentata da questa via, in quanto fonte alternativa di α -KG in grado di sostenere un ciclo di Krebs altrimenti compromesso.

(Finanziato da AIRC START UP, Angela Maria Savino e EHA Advanced Grant, Angela Maria Savino)

2) Determinanti metabolici della disseminazione extramidollare della leucemia mieloide acuta (Lorenzo Manfreda, postdoc-Marta Penco, PhD student)

La capacità della LMA di invadere nicchie extramidollari è spesso sottovalutata, ma può determinare complicanze cliniche severe. Comprendere le differenti esigenze metaboliche della LMA IDH1/2-mutata nei vari distretti è cruciale per pianificare interventi terapeutici mirati. Si ipotizza che la combinazione tra inibizione della via di sintesi della serina (SSP) e della lipogenesi possa colpire efficacemente la malattia nel midollo osseo e, al tempo stesso, prevenire la migrazione verso sedi extramidollari.

Task 1: Delineare l'architettura metabolica delle nicchie primitive ed extramidollari

Dati preliminari indicano che circa il 50% dei PDX mutIDH2 con attecchimento efficace sviluppa infiltrazione del SNC negli stadi avanzati di malattia, oltre a migrare in milza, fegato, linfonodi e cute. La caratterizzazione

metabolica delle cellule leucemiche, tramite quantificazione di metaboliti intracellulari ed extracellulari mediante LC-MS e MALDI-IMAGING ad alta risoluzione (in collaborazione con il Prof. Magni, Università di Milano-Bicocca), permetterà di definire l'architettura delle nicchie e la provenienza dei metaboliti da specifiche popolazioni leucemiche e normali. Verranno eseguite analisi CyTOF su cellule isolate dalle diverse nicchie per ottenere dati proteomici a singola cellula su oltre 40 marcatori. Dati preliminari indicano che la MALDI-IMAGING è in grado di discriminare metaboliti espressi in modo differenziale nell'osso di topi con attecchimento riuscito; è in corso l'ottimizzazione della colorazione in immunofluorescenza per marcatori umani/murini specifici di nicchia. L'imaging mass cytometry (iMC) rappresenta una tecnologia all'avanguardia che integra proteomica e imaging nello stesso strumento. Il modulo di imaging potrà essere facilmente integrato nel CyTOF XT, consentendo la rilevazione simultanea degli antigeni (come descritto nel WP1) mediante anticorpi marcati con metalli. Questa tecnica, recentemente sviluppata per l'analisi tissutale multiplex 3D a risoluzione di singola cellula, permette di evidenziare eterogeneità cellulare e microambientale e l'organizzazione tissutale a livello cellulare, difficilmente apprezzabili con approcci bidimensionali. In collaborazione con la Dr.ssa Sarno (Fondazione Tettamanti) e il Dr. Stuardi (Montpellier), l'iMC verrà implementata per modellare spazialmente l'architettura tridimensionale delle nicchie primitive e metastatiche, poiché la comprensione della tridimensionalità è essenziale per prevenire il comportamento invasivo e migratorio della LMA.

Task 2: Targeting in vivo delle vulnerabilità metaboliche specifiche di nicchia

Le vulnerabilità metaboliche specifiche delle diverse nicchie verranno colpite in vivo combinando interventi dietetici con l'inibizione farmacologica di vie selezionate. Topi trapiantati con campioni di pazienti portatori di mutazioni IDH1/2, selezionati in base alla loro capacità di metastatizzare in sedi extramidollari, saranno espansi mediante trapianti seriali e caratterizzati per la produzione di D-2-HG, utilizzata come read-out funzionale dell'attività enzimatica mutIDH1/2. In una prima fase verrà definita la finestra terapeutica per la combinazione di inibitori della SSP e di SCD1 in presenza di fruttosio e glucosio (8–10 animali per braccio). Le analisi metabolomiche specifiche di nicchia guideranno l'identificazione di ulteriori vulnerabilità metaboliche "drug-gable" e l'ottimizzazione di combinazioni terapeutiche mirate.

(Finanziato da AIRC START UP, Angela Maria Savino e EHA Advanced Grant, Angela Maria Savino)

3) Studio dell'ipossia nella mediazione della risposta e della resistenza ai farmaci nella leucemia mieloide acuta (Lorenzo Manfreda, postdoc-Gloria Maglia, tesi magistrale)

Questa linea di ricerca si inserisce nell'ambito dello studio della resistenza terapeutica nella leucemia mieloide acuta (LMA), una neoplasia in cui la mortalità rimane elevata e la recidiva, spesso precoce, rappresenta una sfida clinica ancora irrisolta. La combinazione azacitidina/venetoclax ha migliorato significativamente gli esiti in sottogruppi selezionati di pazienti anziani o non eleggibili a chemioterapia intensiva; tuttavia, circa il 30–35% dei pazienti presenta resistenza primaria e oltre la metà dei responder va incontro a ricaduta midollare, evidenziando la necessità di strategie terapeutiche razionali di seconda linea. In questo contesto, il microambiente midollare gioca un ruolo cruciale: il midollo osseo è caratterizzato da regioni ipossiche e da un fitto cross talk tra cellule leucemiche e componenti stromali, in particolare le cellule stromali mesenchimali, che contribuiscono a proteggere le cellule di LMA dallo stress citotossico e a promuovere chemioresistenza.

Sebbene i gradienti di ossigeno nel midollo siano stati ampiamente documentati, i meccanismi attraverso cui l'ipossia rimodella i programmi metabolici delle cellule leucemiche e ne favorisce la sopravvivenza sotto terapia restano solo parzialmente compresi. Nel presente progetto verrà approfondito il ruolo dell'ipossia nel guidare adattamenti metabolici della LMA trattata con azacitidina/venetoclax, con l'obiettivo di identificare vulnerabilità sfruttabili terapeuticamente. In particolare, saranno studiati il rimodellamento delle vie energetiche e redox, la riduzione del "priming" apoptotico e il cambio di dipendenza dalle vie BCL-2-correlate in risposta ad aza/ven, per comprendere come queste modificazioni favoriscano la persistenza di cloni resistenti nel midollo. Particolare attenzione sarà rivolta all'attivazione di vie di morte cellulare alternative all'apoptosi, con focus sulla ferroptosi, una forma di morte regolata ferro-dipendente basata su stress ossidativo lipidico. Verrà valutato se l'ipossia e il trattamento con aza/ven convergano nell'aumentare la dipendenza delle cellule leucemiche da specifici assi metabolici (ad esempio metabolismo del glutathione, utilizzo di cisteina e ferro), creando punti di fragilità che possano essere colpiti farmacologicamente per superare la resistenza. I risultati attesi forniranno nuove conoscenze sui programmi metabolici ipossia-guidati che sostengono la sopravvivenza delle cellule di LMA in corso di terapia, aprendo la strada allo sviluppo di combinazioni razionali che integrino aza/ven con agenti capaci di attivare la ferroptosi o colpire bersagli metabolici selettivi.

(Finanziato da AIRC START UP, Angela Maria Savino e EHA Advanced Grant, Angela Maria Savino)

4) Studio della ferroptosi come vulnerabilità metabolica nella leucemia linfoblastica acuta a cellule B e mieloide acuta con mutazione di IDH (Martina Capelletti, postdoc)

Tra i sottotipi di leucemia linfoblastica acuta a cellule B (B-ALL) ad alto rischio definiti su base genomica, quelli caratterizzati dal riarrangiamento del gene KMT2A si associano storicamente a esiti clinici sfavorevoli nonostante l'impiego di protocolli chemioterapici intensivi. In questo scenario, gli inibitori di menin sono emersi come strategia terapeutica mirata di grande interesse per il trattamento delle leucemie KMT2A-riarrangiate, grazie alla loro capacità di interferire con i programmi trascrizionali oncogenici guidati da KMT2A.

In questo progetto viene esplorato se l'inibizione di menin sia in grado di rimodellare lo stato metabolico delle B-ALL KMT2A-riarrangiate, rendendole più vulnerabili allo stress ossidativo. In particolare, è stata caratterizzata la disregolazione dell'omeostasi redox del glutathione come conseguenza chiave del trattamento con inibitori di menin, dimostrando che tale alterazione sensibilizza le cellule leucemiche all'induzione di ferroptosi e apre la strada a combinazioni terapeutiche razionali che sfruttano questa specifica vulnerabilità metabolica.

(Finanziato da Ricerca corrente, Angela Maria Savino)

5) Ruolo del metabolismo del fruttosio nella progressione delle pre-leucemia con mutazione del recettore di IL7 a leucemia a cellule B (Marta Penco, PhD student-Lorenzo Manfreda, postdoc)

L'impatto della disregolazione metabolica sulla predisposizione alla leucemia in età pediatrica è ancora poco esplorato. I fabbisogni dietetici differiscono in modo sostanziale tra bambini e adulti e il carico di esposizione agli zuccheri potrebbe contribuire allo sviluppo della malattia. Si ipotizza che l'esposizione al fruttosio favorisca

la progressione dallo stato pre-leucemico alla B-ALL. Dati preliminari indicano che il trasportatore del fruttosio GLUT5, codificato dal gene SLC2A5, è sovraespresso nella popolazione pre-leucemica portatrice della variante IL7RAins e che tale espressione si mantiene nella leucemia conclamata. Studi precedenti hanno mostrato un'aumentata espressione di SLC2A5 in diversi tumori solidi e nelle neoplasie ematologiche, inclusa la LMA e, più recentemente, la B-ALL pediatrica Ph-like, dove un'elevata espressione di SLC2A5 correla con una maggiore sensibilità agli inibitori tirosin-chinasici, suggerendo nuove opportunità terapeutiche. Tuttavia, il ruolo di SLC2A5 e del metabolismo del fruttosio nella predisposizione e nella trasformazione leucemica non è stato finora chiarito. Dati sperimentali in modelli murini hanno mostrato che l'aggiunta di fruttosio o grassi animali determina una riduzione dell'attecchimento di linee linfoidi nel midollo, suggerendo un possibile effetto inibitorio del fruttosio sulla differenziazione e maturazione delle cellule B e fornendo una possibile spiegazione per l'elevata espressione di SLC2A5 nei progenitori B pre-leucemici IL7RA-mutati. Resta da definire se questa correlazione sia limitata a specifici sottotipi cellulari o rappresenti un meccanismo più generale di iniziazione leucemica. La lesione pre-leucemica più frequente nelle BCP-ALL pediatriche è la fusione ETV6::RUNX1, che caratterizza circa il 25% dei casi. Una maggiore prevalenza di alta espressione di SLC2A5 è stata osservata nei bambini con BCP-ALL e riarrangiamento ETV6::RUNX1, e dati preliminari del nostro gruppo indicano un vantaggio competitivo significativo delle cellule ETV6::RUNX1 rispetto alle controparti wild-type in presenza di fruttosio rispetto al glucosio.

Task 1: Definire il ruolo del metabolismo del fruttosio nella transizione da pre-leucemia a leucemia

In assenza di linee B-ALL portatrici di mutazioni IL7RA (IL7RAins), verranno utilizzate cellule staminali ematopoietiche umane CD34+ trasdotte con IL7RAins o con vettori di controllo. Dopo esposizione a fruttosio o glucosio, verranno valutati proliferazione, ciclo cellulare e stato di differenziamento in saggi a breve termine. Tramite RNA-seq saranno profilati i cambiamenti trascrizionali associati alle diverse fonti zuccherine, con l'obiettivo di identificare geni chiave potenzialmente coinvolti nella regolazione del metabolismo del fruttosio in questo contesto. L'approccio verrà esteso a cellule che esprimono contemporaneamente IL7RAins e SLC2A5 rispetto ai controlli, per studiare l'impatto di SLC2A5 sullo sviluppo delle cellule B, sull'attivazione della via JAK-STAT e sul profilo metabolico, adattando un pannello B-cellulare precedentemente sviluppato per analisi CyTOF. Infine, tali modelli verranno testati in vivo tramite trapianto per valutare, in condizioni di esposizione al fruttosio, la transizione dallo stato pre-leucemico alla leucemia conclamata.

Task 2: Ruolo della via JAK-STAT guidata da IL7RAins nella modulazione di SLC2A5 e dell'uptake di fruttosio.

La proteina di fusione tirosin-chinasica BCR-ABL1 sembra modulare l'espressione di SLC2A5 attraverso MYC; STAT5 è a sua volta noto per regolare l'espressione di c-MYC e potrebbe quindi controllare indirettamente SLC2A5. Utilizzando i modelli generati nel Task 1, verrà inibita la via JAK-STAT e saranno misurati l'espressione dei principali trasportatori di zuccheri e l'uptake di fruttosio. L'obiettivo è valutare se l'inibizione JAK-STAT, in combinazione con una dieta a basso contenuto di zuccheri, possa rappresentare una strategia efficace per eradicare i cloni pre-leucemici alla base delle recidive a lungo termine.

Task 3: Associazione tra trasportatori del fruttosio e profilo mutazionale nella transizione a leucemia conclamata.

Si misurerà l'espressione di SLC2A5 e di altri trasportatori di zuccheri in un'ampia coorte di bambini con B-ALL al momento della diagnosi, sfruttando la biobanca della Fondazione Tettamanti, per valutare l'associazione tra

il loro livello di espressione e il profilo mutazionale (ad esempio IL7RAins, ETV6::RUNX1). Qualora l'espressione dei trasportatori del fruttosio risulti associata alla leucemia conclamata anche in contesti mutazionali diversi da IL7RAins (come ETV6::RUNX1), verranno eseguiti esperimenti funzionali analoghi a quelli descritti nel Task 1. La collaborazione con la Dr.ssa Palmi (Tettamanti Research Center), che vanta ampia esperienza in modelli pre-leucemici guidati da ETV6::RUNX1, sarà fondamentale per l'esecuzione e l'interpretazione di questa parte del progetto.

(Finanziato da AIRC START UP, Angela Maria Savino)

Collaborazione internazionali

- Dr. Michael G. Kharas, Memorial Sloan Kettering Cancer Center, New York, USA.
- Dr. Kayvan Keshari, Memorial Sloan Kettering Cancer Center, New York, USA.
- Dr. Lucille Stuari, INSERM, Montpellier Cancer Institute
- Prof. Daniel Tennant, University of Birmingham, UK

Collaborazione nazionali

- Prof. Isaia Barbieri, Università degli Studi di Torino
- Dr. Ciro Mercurio, IFOM, Milano
- Dr. Angela Bachi, IFOM, Milano
- Dr. Roberta Bortolozzi, Università di Padova
- Dr. Orsola di Martino, Università di Parma
- Dr. Francesca Ficara, CNR, Milano

Monza, 26.05.2026

L'Organo Amministrativo,



Il Direttore Scientifico Prof. Andrea Biondi