

## Dottorato in Medicina Traslazionale e Molecolare DIMET XXXV ciclo

### Borse finanziate dal Dipartimento

**n. 1 borsa finanziata su fondi “Dipartimenti di eccellenza” e vincolata al progetto di ricerca: *“Caratterizzazione degli effetti dei recettori delle citochine lineage-specifici sulle cellule dendritiche derivate da monociti umani”***

L'infiammazione è al centro di molte malattie, persino malattie cardiovascolari e cancro. Il sistema immunitario innato, e specialmente i macrofagi e le cellule dendritiche, sono coinvolti nello sviluppo e nella cronicità delle patologie infiammatorie. La nostra classificazione di queste cellule è influenzata dagli anticorpi disponibili, inoltre pochi marcatori danno informazioni sulla vera relazione di origine delle cellule. Questo progetto ha un ruolo fondamentale ed è quello di migliorare la nostra capacità di preparare colture cellulari dendritiche efficienti nella presentazione dell'antigene e nell'attivazione delle cellule T da usare nella pratica clinica. Sarà valutato il potenziale di diverse combinazioni di citochine per migliorare questa funzione e sarà fatto un confronto con popolazioni esistenti nel sangue per convalidare i nostri modelli.

**n.1 scholarship:” *Characterization of the effects of lineage determining cytokine receptors in human monocyte derived dendritic cells”***

Inflammation is at the heart of many diseases, even cardiovascular disease and cancer. The innate immune system, and specially macrophages and dendritic cells are long lived and involved in the development and chronicity of pathologies. All our classifications are biased towards available antibodies and few markers inform about the true lineage relationship of the cells. There is only one agreement—they must present antigen to naïve T cells.

This project has an overarching role and is that of improving our ability to prepare Dendritic cell cultures with tailored antigen presentation and activation capacity for the clinic. We also want to elucidate if there is therapeutic scope behind unexplored receptors. GM-CSF and IL-4 are the only cytokines used for this. Thus, the potential of other cytokine combinations to improve this function remains unexplored. Further characterization and comparison to existing populations in blood will validate our models and inform about clinical applications.

**n. 1 borsa vincolata al progetto di ricerca: “*Caratterizzazione del profilo mutazionale somatico e germline delle neoplasie mieloproliferative triple-negative*”**

Le neoplasie mieloproliferative (MPN) Philadelphia-negative sono un gruppo di disordini clonali caratterizzati dalla presenza di mutazioni mutuamente esclusive a carico di JAK2, CALR e MPL. Sebbene le mutazioni a carico di questi tre geni rappresentino la gran parte delle varianti associate allo sviluppo di MPN, un sottoinsieme di pazienti affetti da Policitemia Vera (PV; ~1%), Trombocitemia Essenziale (ET; 12-17%) e Mielofibrosi Primaria (PMF; 5-8%) non mostra alcuna evidenza di queste varianti; perciò tali disordini sono definiti come MPN ‘Triple Negative’.

In questo progetto abbiamo in programma di analizzare tramite multiomics Next Generation Sequencing un gruppo di 70 TN-MPN rigorosamente selezionate in modo da caratterizzare i meccanismi molecolari responsabili per lo sviluppo di tali disordini.

**n.1 scholarship: “*Characterization of the somatic and germline mutation landscape of Triple Negative Myeloproliferative Neoplasms*”**

Philadelphia-negative Myeloproliferative Neoplasms (MPN) are a group of clonal disorders characterized by the mutually exclusive presence of acquired somatic mutations in Janus kinase 2 (JAK2), Calreticulin (CALR) and myeloproliferative leukemia virus oncogene (MPL) genes. Although the JAK2, CALR and MPL mutations represent a large fraction of the variants responsible for the onset of MPN, a subset of Polycythemia Vera (PV; ~1%), Essential Thrombocythemia (ET; 12-17%) and Primary Myelofibrosis (PMF; 5-8%) cases shows no evidence of these variants; hence these disorders are referred to as ‘Triple Negative’ MPN (TN-MPN).

In this project we plan to analyze by mean of a multiomics Next Generation Sequencing approach a group of 70 carefully selected TN-MPN patients in order to dissect the molecular mechanisms responsible for the onset of these disorders.

**n. 1 borsa finanziata su fondi e vincolata al progetto di ricerca: “*Approcci di immunoterapia con targeting combinatorio mediata da cellule ingegnerizzate con recettori chimerici (CAR) per il trattamento delle neoplasie a cellule B*”**

Alti tassi di remissione nelle neoplasie a cellule B recidive e refrattarie (r/r) sono stati ottenuti grazie all’utilizzo di cellule T modificate con recettori chimerici (CAR). Tali risultati hanno determinato una rapida autorizzazione di Kymriah e Yescarta, due prodotti farmaceutici che sfruttano CART specifiche per l’antigene CD19. Nonostante l’efficacia

comprovata delle terapie cellulari CAR-T nella leucemia linfoblastica acuta, è necessaria una migliore comprensione dei fattori che influenzano la loro attività clinica per rispondere alla problematica della recidiva di malattia post-CART. Nello specifico, il progetto è incentrato sulla comprensione del ruolo del microambiente tumorale nell'influenzare la risposta delle cellule CART con l'obiettivo finale di promuovere approcci combinati per bersagliare eventuali meccanismi di resistenza. Verranno condotte indagini su pathways di resistenza in campioni prelevati da pazienti sottoposti a immunoterapia con cellule CD3+ killer indotte da citochine modificate in modo non-virale per esprimere il CAR-CD19 (CARCIK-CD19). Le attività comprenderanno la progettazione di approcci di targeting bispecifici per il trattamento delle malattie oncologiche a cellule B e la valutazione di tali approcci combinatori in modelli pre-clinici umanizzati di malattia.

#### **n.1 scholarship: "Combinatorial antigen targeting of B-cell neoplasms by engineered CART cells"**

Chimeric Antigen Receptor (CAR) T cells have achieved high remission rate in relapsed and refractory (r/r) B-cell neoplasms, leading to the rapid authorization of the CD19-targeting Kymriah and Yescarta. Despite the proved efficacy of CAR-T cell therapies in acute lymphoblastic leukemia, future challenges will include a better understanding of factors that influence their clinical activity. Specifically, the project is focused at addressing how the interaction with tumor microenvironment impact on CAR T-cell response with the final aim to foster combined approaches targeting mechanisms of resistance. Investigation of pathways of resistance will be performed on samples from patients undergoing immunotherapy with non-viral CD19CAR modified CD3+ Cytokine Induced Killer cells (CARCIK-CD19). The tasks will include the design of bispecific targeting approaches towards B-cell malignancies and the evaluation of the combinatorial approaches in humanized pre-clinical models of disease.

#### **n. 1 borsa finanziata su fondi e vincolata al progetto di ricerca: "Analisi tissutali contestuali ad alta densità in infiammazione, riparo e trasformazione"**

Caratterizzazione a livello di singola cellula ad alta complessità (> 50 parametri) in situ su tessuto è un approccio nuovo a ridefinire la biologia, lo sviluppo e la patologia di tessuti umani o di mammiferi. Comprende nuovi metodi di immunocolorazione in situ, nuovi approcci ad analisi di immagine, nuovi algoritmi di riduzione dimensionale e resa grafica tissutale. L'applicante ottimale necessiterà possedere nozioni di immunologia, analisi di

immagine, bioinformatica e biostatistica, per sviluppare, applicare e pubblicare dati su tessuti umani.

### **n.1 scholarship: "Tissue-based high-dimensional landscaping in inflammation, repair and transformation"**

Tissue-based, high dimensional (>50 parameters) single cell characterization in situ is a novel approach to re-define biology, development and pathology of human and mammalian tissue. It entails novel in-situ staining methods, novel image analysis approaches, novel dimensional reduction algorithms and tissue rendering of classified cell types. Knowledge of immunology, image analysis, bioinformatics and biostatistics is required to the successful applicant, in order to develop, apply and publish data on human tissue.

### **Borse finanziate da enti esterni**

#### **n. 1 borsa finanziata da ASST Papa Giovanni XXIII vincolata al progetto di ricerca: "Ottimizzazione della produzione di CAR-CIK per studi clinici"**

La possibilità di manipolare geneticamente i linfociti T tramite introduzione di un gene chimerico artificiale, chiamato CAR (Chimeric Antigen Receptor), è diventata una opzione terapeutica praticabile, anche da parte di strutture accademiche come la nostra, se adeguatamente attrezzate e autorizzate dagli Enti Regolatori del Farmaco. Stiamo sviluppando un programma di ricerca atto a produrre cytokine induced killer cells (CIK), che sono linfociti T attivati, geneticamente modificati con un CAR rivolto contro diversi antigeni espressi dalle leucemie/linfomi di tipo B per il trattamento di tali malattie. Uno degli aspetti dello studio è di ottimizzare l'introduzione stabile di diversi CAR (in particolare CD19 e CD20, ma non solo) nelle CIK, mediante sistemi trasposonici (sleeping beauty) piuttosto che retrovirali, di capire i meccanismi che sono alla base di una migliore trasduzione, selezione ed efficacia di diversi CAR nelle cellule stabilmente modificate. Parallelamente il progetto prevede di sviluppare, in una camera bianca della nostra Cell Factory, una "catena" di strumenti sterilmente collegati tra loro che permetta di eseguire l'intero processo produttivo in sistemi chiusi. Questo faciliterà i tempi e la qualità della produzione cellulare richiesta dai protocolli clinici sperimentali in atto e in divenire. Questo progetto è un esempio di ricerca traslazionale che porta un'idea dal laboratorio fino alla clinica, passando per aspetti più tecnologici.

### **n.1 scholarship – “CAR-CIK optimisation production and clinical trial”**

The possibility to genetically manipulate T lymphocytes by stable introduction of a gene expressing a Chimeric Antigen Receptor (CAR), is becoming an amenable therapeutic option, even by academic realities, provided they are properly equipped and specifically authorised by Drug Regulatory Authorities. In this context we are developing a research programme aimed at producing Cytokine Induced Killer cells (CIK), which are T lymphocytes, genetically modified with a CAR and directed against B cell leukemias/lymphoma antigens. One of the aspect of the proposed study is to optimize the stable introduction of several CARs (in particular anti-CD19 and anti-CD20 as well as others) in CIK cells, using trasposonic rather than retroviral systems (sleeping beauty), and to try and understand the mechanisms that are at the base of a better transduction, selection and efficacy of different these different CAR-modified T cells. In parallel, we plan to develop, inside one the cleanroom of our Cell Factory, a “closed” chain of instruments connected by sterile devices, in order to handle in aseptic conditions the entire production process. This objective will facilitate and improve the quality of the production of the CAR-T cells to be used in current and future clinical protocols. This project is a good example of translational research that brings an idea from the bench to the clinic, with a development also of technological aspects.

**n. 5 borse finanziate da Fondazione M. Tettamanti M. De Marchi Onlus vincolate ai seguenti progetti:**

#### **1) *Ricerca di fattori chiave nel crosstalk tra leucemia e stroma da usare come bersagli per nuovi trattamenti terapeutici nella Leucemia Linfoblastica Acuta a Precursori B (BCP-ALL) pediatrica***

La BCP-ALL è in grado di riprogrammare il microambiente midollare al fine di indurlo a produrre fattori che supportano la leucemia e la proteggono dalla chemioterapia. L'obiettivo generale del progetto sarà quello di identificare i segnali derivanti dallo stroma che permettono il mantenimento e la progressione della leucemia, al fine di identificare nuovi meccanismi molecolari da utilizzare come target terapeutici.

#### **1) *Finding key players in leukemia-stroma crosstalk as targets for new treatments in childhood B Cell Precursor Acute Lymphoblastic Leukemia (BCP-ALL)***

BCP-ALL modulates the bone marrow niche to become leukemia-supporting and chemoprotective by reprogramming the stromal microenvironment. The general aim of the project will be to identify stroma-derived signals driving the maintenance and the evolution

of leukemia in order to discover new molecular mechanisms that might be the targets for therapeutic intervention.

## **2) Sviluppo di terapie innovative contro bersagli molecolari in sottogruppi di Leucemia Acuta Linfoblastica pediatrica ad alto rischio**

La leucemia linfoblastica acuta (LAL) è il tumore più frequente nei bambini. Nonostante i miglioramenti raggiunti negli ultimi decenni, il 15% dei pazienti presenta ricaduta di malattia. Il progetto si concentra su tre sottogruppi genetici specifici di LAL pediatrica associati ad alto rischio di recidiva: (i) pazienti con sindrome di Down, (ii) pazienti con alterazioni nel gene PAX5 e (iii) neonati con riarrangiamento del gene MLL. Obiettivo comune consiste nell'identificare nuovi approcci di terapia mirata personalizzata, attraverso modelli preclinici in vitro e in vivo.

## **2) Targeting genetically defined high risk subgroups of childhood acute lymphoblastic leukemia**

Acute lymphoblastic leukemia (ALL) is the most frequent cancer in children. Despite the improvements achieved in last decades, 15% of patients still experience relapse. The proposed project focuses on three specific genetic subgroups of pediatric ALL associated with a high-risk of relapse: (i) patients with Down Syndrome, (ii) patients bearing alterations in PAX5 gene and (iii) infants carrying MLL rearrangement, with the common aim to identify novel therapeutic approaches for a personalized targeted therapy, through in vitro and in vivo preclinical models.

## **3) Predisposizione genetica alla Leucemia Acuta Linfoblastica pediatrica**

Sebbene sia riconosciuto che la leucemia acuta linfoblastica (LAL) ha un'origine multistep, è stata considerata per lungo tempo non ereditabile e con una cronologia breve prima della presentazione clinica. È stata infatti data poca attenzione sia agli eventi genetici predisponenti sia alla fase pre-leucemica. Obiettivo complessivo dello studio è riportare l'attenzione all'origine della LAL pediatrica, la neoplasia più frequente nei bambini, e concentrarsi su mutazioni genetiche costituzionali che aumentano il rischio di contrarre la malattia. Più precisamente, vogliamo identificare sindromi genetiche associate ad un aumentato rischio di sviluppare LAL, per identificare varianti geniche che ne aumentano il rischio. Inoltre, studieremo famiglie con LAL e recidiva di malattia, casi di bambini con tumori multipli o con eccessiva tossicità alla chemioterapia, per identificare varianti geniche rare associate ad un aumentato rischio di malattia, o rischio di alterato metabolismo dei farmaci.

### **3) Genetic predisposition to childhood acute lymphoblastic leukemia**

Although it is recognized that acute lymphoblastic leukemia (ALL) has a multistep origin, it has been considered for long time as not inheritable, and with a typically short history before presentation. Scarce attention has been given to either predisposing genetic events as well as to the pre-leukemic phase. We aim to move the attention back to the origin of childhood ALL, the most frequent malignancy in children, and focus on constitutional genetic mutations that increase ALL risk. More precisely, we aim at identifying genetic syndromes associated with an increased risk to develop ALL, as a 'short cut' to identify ALL risk genes. Moreover, we will study families with ALL and cancer recurrence, children cases with multiple tumors, or with excessive toxicity to chemotherapy, to identify rare specific gene variants associated to increased risk of disease, or risk of altered drug metabolism.

### **4) Caratterizzazione dei meccanismi di mantenimento della cellula pre-leucemica TEL/AML1 positiva**

TEL/AML1, il gene di fusione più comune nella leucemia acuta linfoblastica (LAL) pediatrica, è un fattore di trascrizione aberrante generato durante l'emopoiesi fetale. La sua attività produce un clone pre-leucemico clinicamente nascosto nel compartimento dei progenitori B, che può persistere dopo la nascita per diversi anni. Ulteriori anomalie genetiche sono necessarie per il passaggio alla presentazione clinica di LAL. Questo studio si propone di identificare e comprendere i meccanismi molecolari che consentono al clone pre-leucemico di persistere silente in un individuo per diversi anni, in attesa di ulteriori eventi genomici. La comprensione di tali meccanismi è cruciale per sviluppare strategie per l'efficace eradicazione e prevenzione della leucemia. In particolare, utilizzeremo modelli in vitro e in vivo per indagare se la cellula pre-leucemica TEL/AML1 abbia un'alterata interazione con il microambiente midollare e per identificare possibili funzioni di promozione tumorale della nicchia midollare, specialmente in condizioni infiammatorie.

### **4) Unraveling the mechanisms sustaining the TEL/AML1 positive pre-leukemic cell**

TEL/AML1, the most common fusion gene in childhood acute lymphoblastic leukemia (ALL), is an aberrant transcription factor generated during fetal hemopoiesis. Its activity produces a clinically covert pre-leukemic clone in B progenitor compartment that can persist post-natally for several years. Additional genetic abnormalities are necessary for the transition to ALL. This study has the ambition to identify and understand the molecular mechanisms that allow pre-leukemic clone to persist covertly in an individual for several years, likely prone to additional genomic events, are crucial in order to develop strategies for its effective eradication and leukemia prevention. In particular, we will use in vitro and in vivo models to investigate if TEL/AML1+ pre-leukemic cell has an altered interaction with BM

microenvironment and to identify possible tumor-promoting functions of the niche, especially under inflammatory conditions.

### **5) La nicchia nella leucemia pediatrica.**

Nonostante notevoli progressi, i meccanismi coinvolti nella regolazione della nicchia ematopoietica maligna del midollo osseo rimangono in gran parte sconosciuti, principalmente a causa della limitata disponibilità di modelli in vivo che imitano la nicchia umana.

Dati recenti suggeriscono che le cellule staminali leucemiche (LSC) sono dipendenti dalla nicchia riguardo all'attecchimento, alla resistenza alla chemioterapia e alla regolazione del ciclo cellulare. I modelli di imaging dinamico in vivo mostrano che le LSC maligne dirottano la normale nicchia per creare un microambiente che favorisca la loro sopravvivenza e sopprimono la normale emopoiesi. Dato che questi dati sono stati generati in contesti di xeno-trapianto, lo scopo principale del progetto sarà quello di verificare questi aspetti in un microambiente di origine umana utilizzando modelli in vitro ed in vivo.

### **5) The niche in childhood acute leukemias**

Despite considerable progress, the mechanisms involved in the regulation of the malignant bone marrow hematopoietic niche remain largely unknown, mainly because of the limited availability of in vivo models that mimic the human niche.

Recent data suggest that leukemic stem cells (LSC) are niche-dependent for engraftment, chemotherapy resistance and cell cycle regulation. In vivo dynamic imaging models show that malignant LSCs hijack the normal niche to create a microenvironment that favors their survival, and suppress normal hematopoiesis. Since these data have been generated in xeno-transplant settings, the general aim of the project will be to address these aspects in a microenvironment of human origin adopting in vitro and in vivo models.

## **Posizione con Percorso Executive**

**n.1 reserved to employees of Fondazione IRCCS Istituto Neurologico “Carlo Besta” related to research project**

*The role of radiotherapy immunotherapy combination for brain tumour and the potential role of focus ultrasound as enhancer: discovering a cutting-edge treatment of the future. (The synergy of radiotherapy and immunotherapy for brain tumors: a win-win combination?)*



In the current era of immuno-oncology, in which stimulating the immune system holds the promise of extending survival for patients with advanced cancer, radiation is playing a new role by acting as a systemic treatment thanks to its immunomodulatory capabilities.

To date, immunotherapy is a much-needed paradigm shift in cancer treatment with dramatic impact on tumor response, overall survival, and quality of life in the last decade than in the past. Radiation can enhance the proportion of patients who derive a benefit from cancer immunotherapy and the duration of their response. Radiation oncology planning and delivery is traditionally highly individualized: elucidating patient-specific factors that control tumor response in combination with immunotherapy will advance personalized cancer care. Moreover, combining the ablative capabilities of focused ultrasound with its other unique effects, such as blood-brain barrier disruption and radiosensitization, may eventually result in change of the current glioma treatment paradigm. Only rigorously conducted preclinical and clinical trials can address all dilemma in this field.

The aim of this projects is to explore the safety and efficacy of radiotherapy and immunotherapy combination for brain tumours and to evaluate radiation regimens that might potentially enhance both the immunomodulatory and tumoricidal effects of radiotherapy. Another objective is to investigate one of the main hurdle that needs to be overcome in this area, the highly immunosuppressive nature of the tumor microenvironment, which hampers the efficacy of immunotherapies. Moreover, also the role of focus ultrasound as therapeutic enhancer will be evaluated.

Preclinical studies and clinical trials will be carried out to confirm already established results and to evaluate possible answers still pending.

#### **Mandatory exam**

One at the end of each year