

Rendicontazione 5 per mille Anno 2022 Ministero della Salute

Codice	Titolo / Istituto	Data inizio	Data fine	Finanziamento assegnato
5M-2022-23682226	5 per mille generico per com... (TELETHON)			99.999.999.999,00
5M-2022-23685603	GF_Ferrari G._Comprensione... (TELETHON)	01/01/2022	31/12/2025 (31/12/2024)	139.030,06
5M-2022-23685604	BG_Gentner B._Espansione ... (TELETHON)	01/01/2022	31/12/2025 (31/12/2024)	116.883,00
5M-2022-23685605	AV_Villa A._Analisi della funz... (TELETHON)	01/01/2022	31/12/2025 (31/12/2024)	119.502,00
5M-2022-23685606	AM_Mortellaro A._Studio dell... (TELETHON)	01/01/2022	31/12/2025 (31/12/2024)	157.881,00
5M-2022-23685607	AL_Lombardo A._Sviluppo di... (TELETHON)	01/01/2022	31/12/2025 (31/12/2024)	205.645,00
5M-2022-23685608	AG_Gritti A._Utilizzo di nuov... (TELETHON)	01/01/2022	31/12/2025 (31/12/2024)	223.329,00



Ministero della Salute – Direzione Generale della Ricerca e dell’Innovazione in Sanità

Fondi 5 per mille ANNO 2022

Abstract ed elenco pubblicazioni scientifiche

Ente della Ricerca Sanitaria Denominazione Ente: Fondazione Telethon Etss

Codice fiscale: 04879781005

Sede legale: Via Varese 16b – 00185 Roma

Indirizzo di posta elettronica dell'ente: direzione.generale@telethon.legalmail.it

Dati del rappresentante legale delegato: Luca Cordero di Montezemolo

Titolo del progetto: GF_Ferrari G._Comprensione e targeting dell'emopoiesi e delle interazioni HSC-nicchia nelle malattie associate allo stress eritropoietico.

Abstract dei risultati ottenuti:

Partendo dai nostri risultati di ridotta funzionalità della cellula staminale ematopoietica (CSE) nell'anemia congenita beta-talassemia (Bthal) (Aprile *et al.*, *Blood* 2020), abbiamo investigato gli aspetti peculiari della patologia, quali l'alterato metabolismo osseo, l'accumulo di ferro e fattori ormonali, che possono interferire con il mantenimento della CSE. Lo scopo principale della nostra ricerca è quello di comprendere gli elementi cellulari e molecolari che regolano l'emopoiesi e l'interazione tra CSE e nicchia del midollo osseo (MO) in questa patologia associata a stress eritropoietico.

Abbiamo esplorato il ruolo dell'ormone fattore di crescita dei fibroblasti-23 (FGF23) nei difetti ossei e della nicchia del MO in Bthal, dimostrando l'efficacia della sua inibizione per bersagliare la nicchia e recuperare la funzione della CSE. Abbiamo scoperto che FGF23 rappresenta il collegamento molecolare tra l'anemia e il difetto osseo e questa conoscenza potrà portare a nuove strategie terapeutiche finalizzate a migliorare la CSE e il microambiente del MO in un contesto di trapianto e terapia genica. Abbiamo inoltre considerato come l'accumulo di ferro caratteristico della Bthal e dell'anemia falciforme regoli il metabolismo delle CSE, danneggiando i mitocondri e la loro funzione metabolica attraverso la generazione di specie reattive dell'ossigeno. La riduzione delle specie reattive dell'ossigeno mitocondriali si è rivelata un approccio efficace per recuperare la funzione delle CSE e ribilanciare il loro stato metabolico. Ci siamo quindi focalizzati su un'altra alterazione sistemica individuata nel modello murino di Bthal, la riduzione cronica della citochina trombopoietina (TPO). Abbiamo sfruttato questa anemia genetica come modello per studiare un meccanismo molecolare più generale, quale il ruolo della TPO sulla CSE e sui megacariociti (Mk) che hanno una funzione di supporto della nicchia del MO. Abbiamo dimostrato che livelli ridotti di TPO hanno un effetto negativo sulla staminalità e sul differenziamento verso Mk della CSE e causano una minor maturazione dei Mk, contribuendo così ad un'alterata interazione tra CSE e nicchia.

Queste evidenze e le attività di ricerca in corso ci permetteranno di studiare la complessa interazione tra CSE e le diverse componenti alterate della nicchia midollare al fine di sviluppare terapie combinate nel contesto di trapianto e terapia genica per migliorare le CSE e la nicchia in Bthal e anemia falciforme.

Prodotti della Ricerca (correlati al progetto):

Elenco pubblicazioni su riviste indicizzate

Aprile A., Sighinolfi S., Raggi L. and Giuliana Ferrari. *Targeting the Hematopoietic Stem Cell Niche in β -Thalassemia and Sick Cell Disease. Pharmaceuticals.* 2022 May 11;15(5):592. (Review) doi: 10.3390/ph15050592

Aprile A., Raggi L., Bolamperti S., Villa I., Storto M., Morello G., Marktel S., Tripodo C., Cappellini MD, Motta I., Rubinacci A. and Ferrari G. *Inhibition of FGF23 is a therapeutic strategy to target hematopoietic stem cell niche defects in beta-thalassemia. Science Translational Medicine.* 2023 May 31;15(698):eabq3679. doi: 10.1126/scitranslmed.abq3679

Aprile A., Lidonnici MR. and Ferrari G. *Gene therapy for hemoglobinopathies: clinical trial results and relevant biology of hematopoietic stem cell and the bone marrow niche. Cell Reports Medicine* 2025 Nov 17:102419. (Review) doi: 10.1016/j.xcrm.2025.102419

Elenco risultati non pubblicati

Sighinolfi S., Cassina L., Lidonnici MR., Beretta S., Stefanoni D., Storto M., Mayerhofer C., Kristiansen TA., Scadden DT., Merelli I., Boletta A., Aprile A. and Ferrari G. *Iron overload damages mitochondria and induces metabolic rewiring of hematopoietic stem cells towards glycolysis*. Blood, in revisione.

Aprile A., Malara A., Storto M., Gulino A., Cancila V., Morello G., Raggi L., Sighinolfi S., Beretta S., Merelli I., Marktel S., Ponzoni M., Tripodo C., Balduini A. and Ferrari G. *A genetic anemia untangles the dual effect of chronically reduced thrombopoietin on hematopoietic stem cells and the bone marrow niche*. Manoscritto pronto alla sottomissione.

Data inizio progetto: 01/01/2022

Data fine progetto: 31/12/2024

Data proroga: 31/12/2025

Valore progetto: 139.030,06

Valori economici:

Personale - Quota sostenuta alla data di rendicontazione: 88.561,00

Materiali di consumo - Quota sostenuta alla data di rendicontazione: 50.469,06

Totale complessivo quota 5 per mille progetto euro 139.030,06



Ministero della Salute – Direzione Generale della Ricerca e dell’Innovazione in Sanità

Fondi 5 per mille ANNO 2022

Abstract ed elenco pubblicazioni scientifiche

Ente della Ricerca Sanitaria Denominazione Ente: Fondazione Telethon Etss

Codice fiscale: 04879781005

Sede legale: Via Varese 16b – 00185 Roma

Indirizzo di posta elettronica dell'ente: direzione.generale@telethon.legalmail.it

Dati del rappresentante legale delegato: Luca Cordero di Montezemolo

Titolo del progetto: BG_Gentner B._Espansione ex vivo di cellule ematopoietiche staminali e progenitrici geneticamente modificate

Abstract dei risultati ottenuti:

Negli ultimi 5 anni abbiamo eseguito un'ottimizzazione approfondita e iterativa di tutte le fasi critiche coinvolte nella modificazione genetica e nell'espansione ex vivo delle cellule staminali e progenitrici ematopoietiche derivate dal sangue periferico mobilizzato, che rappresenta la fonte di cellule staminali di maggiore rilevanza clinica per le terapie cellulari, compresa la terapia genica. Questo lavoro ha consentito di identificare i parametri critici da controllare per una coltura efficace di cellule staminali e progenitrici ematopoietiche geneticamente modificate, inclusi la composizione dei terreni di coltura, la supplementazione con citochine e small molecules, nonché la tempistica e il dosaggio della trasduzione lentivirale e delle procedure di editing genetico.

Tutto ciò è stato realizzato utilizzando i più rigorosi standard di riferimento, come lo xenotrapianto, nonché test innovative emergenti, come la caratterizzazione multiomica “single cell” e l’analisi a risoluzione clonale della coltura HSC. Sulla base di queste ottimizzazioni del protocollo, sono state intraprese attività di sviluppo del processo finalizzate a garantire la compatibilità con gli standard GMP e consentire una scalabilità adeguata al trattamento di pazienti pediatrici. La solidità del protocollo è stata ampiamente verificata e il processo è stato trasferito con successo in una struttura GMP, per essere applicato nella sperimentazione clinica di fase 1.

Prodotti della Ricerca (correlati al progetto):

Elenco pubblicazioni su riviste indicizzate

- Approvazione di uno studio clinico (2024-518972-30-00) da parte dell’ente regolatoria italiana: A phase I/II open label study to assess safety, feasibility and efficacy of ex vivo expanded, autologous haematopoietic stem and progenitor cell populations that contain CD34+ cells transduced with a lentiviral vector encoding the TCIRG1 cDNA in children with autosomal recessive osteopetrosis caused by mutations in the TCIRG1 gene.
- Zonari E, Naldini MM, Barcella M, [...], Gentner B. Expansion of Hematopoietic Stem and Progenitor Cells from Human Mobilized Peripheral Blood for Gene Therapy. *Invited revision*.
- Della Volpe L, Midena F, Vacca R, [...], Di Micco R. A p38 MAPK-ROS axis fuels proliferation stress and DNA damage during CRISPR-Cas9 gene editing in hematopoietic stem and progenitor cells. *Cell Rep Med*. 2024 Nov 19;5(11):101823. doi: 10.1016/j.xcrm.2024.101823.
- Quaranta P, Basso-Ricci L, Jofra Hernandez R, [...] Scala S. Circulating hematopoietic stem/progenitor cell subsets contribute to human hematopoietic homeostasis. *Blood*. 2024 May 9;143(19):1937-1952. doi: 10.1182/blood.2023022666.
- Fiumara M, Ferrari S, Omer-Javed A, [...], Naldini L. Genotoxic effects of base and prime editing in human hematopoietic stem cells. *Nat Biotechnol*. 2024 Jun;42(6):877-891. doi: 10.1038/s41587-023-01915-4.
- Pievani A, Granata V, Desantis G, [...], Serafini M. CD14 positive cells accelerate hematopoietic stem cell engraftment. *Bone Marrow Transplant*. 2022 Jun;57(6):942-948. doi: 10.1038/s41409-022-01662-1.
- **Capo V, Penna S, Merelli I, [...] Villa A.** Expanded circulating hematopoietic stem/progenitor cells as novel cell source for the treatment of TCIRG1 osteopetrosis. *Haematologica*. 2021 Jan 1;106(1):74-86. doi: 10.3324/haematol.2019.238261.

Data inizio progetto: 01/01/2022

Data fine progetto: 31/12/2024

Data proroga: 31/12/2025

Valore progetto: 116.883,00

Valori economici:

Personale - Quota sostenuta alla data di rendicontazione: 40.179,00

Materiali di consumo - Quota sostenuta alla data di rendicontazione: 76.704,00

Totale complessivo quota 5 per mille progetto euro 116.883,00



Ministero della Salute – Direzione Generale della Ricerca e dell’Innovazione in Sanità

Fondi 5 per mille ANNO 2022

Abstract ed elenco pubblicazioni scientifiche

Ente della Ricerca Sanitaria Denominazione Ente: Fondazione Telethon Etss

Codice fiscale: 04879781005

Sede legale: Via Varese 16b – 00185 Roma

Indirizzo di posta elettronica dell'ente: direzione.generale@telethon.legalmail.it

Dati del rappresentante legale delegato: Luca Cordero di Montezemolo

Titolo del progetto: AV_Villa A. _Analisi della funzionalità della nicchia midollare nell’osteopetrosi e implicazioni della terapia cellulo-mediata per la cura della osteopetrosi da difetto del gene *TCIRG1*

Abstract dei risultati ottenuti:

L’osteopetrosi autosomica recessiva (ARO) è una rara malattia genetica infantile caratterizzata dalla mancata funzionalità degli osteoclasti con conseguente alterato riassorbimento osseo. La maggior parte dei casi (circa il 50%) è causata da mutazioni nel gene *TCIRG1*, che codifica per la subunità $\alpha 3$ della pompa vacuolare la cui attività è responsabile della acidificazione della matrice ossea e conseguente riassorbimento dell’osso. Il mancato rimodellamento osseo determinato dal difettoso funzionamento degli osteoclasti causa fibrosi del midollo osseo, conseguente ematopoiesi extra midollare ed aumento di cellule staminali ematopoietiche e progenitori (CD34+) in circolo nel sangue periferico. La severa pancitopenia, la fibrosi midollare e le severe infezioni ricorrenti portano a morte precoce nei primi anni di vita. Unica terapia disponibile è il trapianto allogenico di cellule staminali ematopoietiche (HSC), il cui successo è determinato dalla severità della malattia, dalla disponibilità di un donatore compatibile e dai severi effetti collaterali causati dal condizionamento chemioterapico. La terapia genica (GT) con cellule autologhe corrette rappresenta quindi una promettente terapia alternativa. Tuttavia, il successo della GT potrebbe essere limitato dalla fibrosi della nicchia midollare. Per superare questi ostacoli, abbiamo ottimizzato un nuovo protocollo di terapia genica che combina la trasduzione lentivirale con l’espansione *ex-vivo* delle HSPC mediante UM171. Tale procedura di espansione di cellule corrette geneticamente consentirebbe di massimizzare la dose infusa di cellule staminali e progenitrici ematopoietiche (HSPC) nei pazienti con ARO. Abbiamo pertanto analizzato la efficacia di tale protocollo dimostrando la correzione della capacità riassorbitiva degli osteoclasti e in parallelo il mantenimento della staminalità delle cellule HSPC espanse e trasdotte, e la clonogenic potential. CD34 trasdotte ed espanse trapiantate in modelli murini immunodeficienti (NSG) hanno attecchito sia in trapianti primari che secondari e si sono differenziate nelle diverse linee ematopoietiche (*Capo et al, 2021*). In stretta collaborazione con il gruppo process and development laboratory (PDL) abbiamo ottimizzato questa piattaforma di trasduzione ed espansione al fine del trasferimento nel protocollo clinico. Sono stati eseguiti studi in GLP al fine di valutare possibile tossicità overesprimendo il transgene ed abbiamo valutato la biodistribuzione delle cellule trasdotte ed espanse dimostrando l’assenza di effetti collaterali in caso di over espressione e una normale biodistribuzione. Risultati di questi studi sono stati sottomessi all’agenzia regolatoria AIFA per l’approvazione della sperimentazione clinica, ottenendo l’autorizzazione per lo studio Phase I/II (Agosto 2025).

In collaborazione con un gruppo UCL (Prof R. Chiesa, GOSH London) abbiamo avuto la possibilità di processare aferesi ottenute da 3 pazienti osteopetrotici dimostrando la capacità delle cellule HSPC trasdotte ad espandersi, a differenziarsi in osteoclasti capaci riassorbire l’osso in vitro, il mantenimento della stemness e la capacità di colonizzare in vivo il midollo osseo sia in trapianti primari che secondari in topi immunodeficienti.

Studi paralleli sono stato eseguiti nel modello murino di osteopetrosi, il modello *oc/oc* che ricapitola il fenotipo della malattia. I topi affetti muoiono nei primi giorni di vita (attorno a 10 gg). In tale modello abbiamo dimostrato la efficacia della terapia genica (*Penna et al. 2024*) dimostrando nei topi trattati con GT dei livelli di sopravvivenza superiori a quelli trattati con trapianto di midollo. Il modello *oc/oc* è stata una piattaforma importante anche per testare il protocollo di espansione e trasduzione di cellule staminali ematopoietiche (LKS). Tale protocollo sebbene diverso da quello utilizzato nell’uomo, ha dimostrato risultati molto promettenti con una sopravvivenza di tutti i topi trattati ed efficacia sia in trapianti primari e secondari. Studi sulla caratterizzazione cellulare e molecolare di queste cellule sono ancora in corso.

Infine il modello murino *oc/oc* ha permesso di valutare la mobilitazione della HSPC dato il processo di fibrosi midollare e in parallelo studiare la efficacia di nuovi protocolli di condizionamento biologico. Abbiamo pertanto fatto tali studi in topi neonati nei primissimi giorni di vita dimostrando una diversa cinetica di mobilitazione e fornendo “proof of concept” della efficacia di nuovi protocolli di condizionamento non genotossico basati su anticorpi anti-CD45 e anti-cKit coniugati a saporine (SAP). Abbiamo poi condotti studi nel modello murino testando feasibility e cinetica della mobilitazione (Plerixafor). Infine, in collaborazione con Dr M Milani abbiamo dimostrato la efficacia della terapia genica in vivo nel modello *oc/oc* dimostrando che la iniezione di vettore LV PGK TCIRG1 in topi neonati (al giorno 1 di vita) è in grado di trasdurre cellule HSPC circolanti nei topi neonati correggendo la capacità degli osteoclasti a riassorbire la matrice ossea con conseguente miglioramento del fenotipo osseo e allungamento del survival dei topi trattati(*Milani et al., 2025*) .

Prodotti della Ricerca (correlati al progetto):

Elenco pubblicazioni su riviste indicizzate

Cappelleri A, Canesi S, **Capo V**, Zecchillo A, Notarangelo LD, Draghici E, Bettoni V, Martini V, Moretti P, Villa A, Paltrinieri S, Scanziani E, Recordati C. A standardized protocol for assessing immunodeficiency in mouse models. *Vet Pathol.* 2025 Aug 28;3009858251361517. doi: 10.1177/03009858251361517. Online ahead of print.

Milani M, Fabiano A, Perez-Rodriguez M, Hernandez RJ, Zecchillo A, Zonari E, Ottonello S, Basso-Ricci L, Canepari C, Volpin M, Iannello V, Capo V, Quaranta P, Seffin L, Russo F, Biffi M, Ormoli L, Brombin C, Carlucci F, Forlino A, Filibian M, Montini E, Scala S, Villa A, Bueren JA, Rio P, Aiuti A, Cantore A, Naldini L. In vivo haemopoietic stem cell gene therapy enabled by postnatal trafficking *Nature.* 2025 Jul;643(8073):1097-1106. doi: 10.1038/s41586-025-09070-3. Epub 2025 May 28.PMID: 40437086

Penna S, Zecchillo A, Di Verniere M, Fontana E, Iannello V, Palagano E, Mantero S, Cappelleri A, Rizzoli E, Santi L, Crisafulli L, Filibian M, Forlino A, Basso-Ricci L, Scala S, Scanziani E, Schinke T, Ficara F, Sobacchi C, Villa A, Capo V. Correction of osteopetrosis in the neonate *oc/oc* murine model after lentiviral vector gene therapy and non genotoxic conditioning . *Front Endocrinol (Lausanne).* 2024 Sep 9;15:1450349. doi: 10.3389/fendo.2024.1450349. eCollection 2024.PMID: 39314524

Capo V, Abinun M, Villa A. Osteoclast rich osteopetrosis due to defects in the TCIRG1 gene. *Bone.* 2022 Dec;165:116519. doi: 10.1016/j.bone.2022.116519. Epub 2022 Aug 15.PMID: 35981697

Penna S, Villa A, Capo V. Autosomal recessive osteopetrosis: mechanisms and treatments *Dis Model Mech.* 2021 May 1;14(5):dmm048940. doi: 10.1242/dmm.048940. Epub 2021 May 10.PMID: 33970241

Capo V, Penna S, Merelli I, Barcella M, Scala S, Basso-Ricci L, Draghici E, Palagano E, Zonari E, Desantis G, Uva P, Cusano R, Sergi L, Crisafulli L, Moshous D, Stepensky P, Drabko K, Kaya Z, Unal E, Gezdirici A, Menna G, Serafini M, Aiuti A, Locatelli SL, Carlo-Stella C, Schulz AS, Ficara F, Sobacchi C, Gentner B, Villa A. Expanded circulating hematopoietic stem/progenitor cells as novel cell source for the treatment of TCIRG1 osteopetrosis. *Haematologica.* 2021 Jan 1;106(1):74-86. doi: 10.3324/haematol.2019.238261.PMID: 31949009

Data inizio progetto: 01/01/2022

Data fine progetto: 31/12/2024

Data proroga: 31/12/2025

Valore progetto: 119.502,00

Valori economici:

Personale - Quota sostenuta alla data di rendicontazione: 45.509,00

Materiali di consumo - Quota sostenuta alla data di rendicontazione: 73.993,00

Totale complessivo quota 5 per mille progetto euro 119.502,00



Ministero della Salute – Direzione Generale della Ricerca e dell’Innovazione in Sanità

Fondi 5 per mille ANNO 2022

Abstract ed elenco pubblicazioni scientifiche

Ente della Ricerca Sanitaria Denominazione Ente: Fondazione Telethon Etss

Codice fiscale: 04879781005

Sede legale: Via Varese 16b – 00185 Roma

Indirizzo di posta elettronica dell'ente: direzione.generale@telethon.legalmail.it

Dati del rappresentante legale delegato: Luca Cordero di Montezemolo

Titolo del progetto: AM_Mortellaro A. Studio della patogenesi e sviluppo della terapia genica per il deficit di adenosina deaminasi 2

Abstract dei risultati ottenuti:

Il deficit di adenosine deaminase 2 (DADA2) è una malattia monogenica caratterizzata da infiammazione sistemica, vasculopatia e disfunzione immuno-ematologica. Abbiamo dimostrato che le alterazioni del compartimento midollare rappresentano una componente precoce e intrinseca della patologia. L’analisi del midollo osseo di pazienti con DADA2, attraverso diversi fenotipi clinici e gradi di severità, rivela una marcata riduzione delle cellule staminali e progenitrici ematopoietiche, un’alterata composizione delle popolazioni mieloidi e la presenza di segnali di stress cellulare e infiammazione, anche in assenza di manifestazioni ematologiche clinicamente evidenti. Parallelamente, emergono alterazioni funzionali della nicchia midollare, che risulta meno efficiente nel supportare il mantenimento, la proliferazione e la differenziazione delle cellule staminali ematopoietiche. Queste evidenze indicano che il difetto ematopoietico nella DADA2 non è una conseguenza secondaria dell’infiammazione sistemica, ma riflette un meccanismo patogenetico centrale che coinvolge sia le cellule staminali ematopoietiche sia il microambiente midollare che ne regola l’omeostasi.

In parallelo, è stato valutato un approccio di terapia genica nelle cellule staminali ematopoietiche derivate da pazienti affetti da DADA2, basato sulla loro correzione mediante vettori lentivirali esprimenti ADA2. I risultati dimostrano che la terapia genica consente una ricostituzione stabile e a lungo termine dell’ematopoiesi, con un engraftment duraturo delle cellule corrette, un differenziamento multilineare efficiente e il ripristino dell’espressione di ADA2 nelle cellule ematopoietiche derivate dai pazienti. Tale approccio risulta associato a un miglioramento delle alterazioni funzionali delle cellule mieloidi e non evidenzia segni di tossicità legati alla trasduzione o alla sovraespressione del transgene.

Nel complesso, questi studi definiscono la DADA2 come una patologia caratterizzata da difetti cellulo-intrinseci del compartimento ematopoietico e forniscono una solida prova di principio che la correzione genetica delle cellule staminali ematopoietiche rappresenti una strategia terapeutica efficace e potenzialmente risolutiva.

Prodotti della Ricerca (correlati al progetto):

Elenco pubblicazioni su riviste indicizzate

- Rigamonti C, Bulté D, Barzaghi F, Mesa-Nuñez C, Basso-Ricci, Pettinato E, Visconti C, Degl’Innocenti S, Gazzo F, Benedicenti F, Arévalo S, Quaranta P, Sanvito F, Caorsi R, Schena F, Lupia M, Federici S, Insalaco A, De Benedetti F, Scala S, Miano M, Conti F, Cicalese MP, Montini E, Gattorno M, Dufour C, Aiuti A, **Mortellaro A**. Gene therapy supports long-term reconstitution of patient hematopoietic stem cells in deficiency of adenosine deaminase 2. *Mol Ther Methods Clin Dev*. 2025;33(4):101624.
- Bulté D, Barzaghi F, Mesa-Nuñez C, Rigamonti C, Basso-Ricci L, Visconti C, Crippa S, Pettinato E, Gilioli D, Milani R, Quaranta P, Caorsi R, Cafaro A, Cangemi G, Lupia M, Schena F, Grossi A, Di Colo G, Federici S, Insalaco A, De Benedetti F, Markt S, Di Micco R, Bernardo ME, Scala S, Cicalese MP, Conti F, Miano M, Gattorno M, Dufour C, Aiuti A, **Mortellaro A**. Early bone marrow alterations in patients with adenosine deaminase 2 deficiency across disease phenotypes and severities. *J Allergy Clin Immunol*. 2025;155(2):616-627.e8.

Data inizio progetto: 01/01/2022

Data fine progetto: 31/12/2024

Data proroga: 31/12/2025

Valore progetto: 157.881,00

Valori economici:

Personale - Quota sostenuta alla data di rendicontazione: 131.393,00

Materiali di consumo - Quota sostenuta alla data di rendicontazione: 26.488,00

Totale complessivo quota 5 per mille progetto euro 157.881,00



Ministero della Salute – Direzione Generale della Ricerca e dell’Innovazione in Sanità

Fondi 5 per mille ANNO 2022

Abstract ed elenco pubblicazioni scientifiche

Ente della Ricerca Sanitaria Denominazione Ente: Fondazione Telethon Etss

Codice fiscale: 04879781005

Sede legale: Via Varese 16b – 00185 Roma

Indirizzo di posta elettronica dell'ente: direzione.generale@telethon.legalmail.it

Dati del rappresentante legale delegato: Luca Cordero di Montezemolo

Titolo del progetto: AL_Lombardo A._Sviluppo di una piattaforma di editing epigenetico per il trattamento della malattia di Huntington.

Abstract dei risultati ottenuti:

La malattia di Huntington (HD) è un disordine neurodegenerativo a trasmissione autosomica dominante causato da un’espansione patologica monoallelica di ripetizioni CAG nell’esone 1 del gene Huntingtin (HTT), che porta alla produzione di una proteina tossica. Alla luce della sua patogenesi, il silenziamento di HTT è considerato una strategia terapeutica promettente in grado di modificare il decorso della malattia. Tra le strategie di silenziamento genico, l’editing epigenetico è particolarmente attraente, poiché consente una repressione genica duratura senza indurre rotture del DNA potenzialmente genotossiche (Amabile et al., Cell 2016). Sulla base di nostri precedenti lavori che hanno dimostrato un silenziamento genico persistente in vivo mediante la somministrazione transitoria di Repressori Trascrizionali Ingegnerizzati (RTI) (Cappelluti et al., Nature 2024), qui abbiamo sviluppato e confrontato due strategie alternative di editing epigenetico mirate a HTT: (i) il silenziamento bialelico di entrambi gli alleli e (ii) il silenziamento selettivo dell’allele con l’espansione patologica, preservando l’espressione dell’allele wild-type. Per la strategia bialelica, abbiamo progettato una libreria di migliaia di gRNA che coprono l’intera regione regolatoria di HTT ed eseguito uno screening utilizzando RTI basati su dCas9 in una linea cellulare che riporta per l’espressione di HTT. In questo screening abbiamo identificato diversi gRNA in grado di indurre una repressione elevata (>90%) e duratura (>2 mesi) di HTT. L’analisi dell’espressione genica mediante RNA sequencing (RNA-seq) nelle cellule editate ha rivelato un’elevata specificità, con meno di tre geni differenzialmente espressi oltre a HTT. Successivamente, abbiamo validato gli RTI più efficaci in cellule staminali neurali, nelle quali abbiamo osservato un silenziamento di HTT di circa il 50% persistente per oltre un mese, mantenuto anche dopo la differenziazione in vitro verso lignaggi neuronali. Per la strategia di silenziamento allele-specifico, abbiamo ingegnerizzato RTI basati su tre differenti piattaforme di legame al DNA: dCas9, TALE e ZFP, tutte progettate per riconoscere selettivamente l’espansione di ripetizioni CAG presente nell’allele patologico di HTT. Per consentire una valutazione quantitativa e allele-specifica del silenziamento, abbiamo generato una linea cellulare umana a doppio reporter contenente sia un allele HTT wild-type sia un allele HTT con espansione patologica (81 ripetizioni CAG), ciascuno marcato con un distinto marcatore fluorescente. Questo sistema ci ha permesso di misurare in modo indipendente l’attività degli RTI su ciascun allele. Gli RTI più performanti di ciascuna piattaforma hanno mostrato una repressione potente e selettiva dell’allele mutante, con oltre il 90% delle cellule caratterizzate da un silenziamento esclusivo dell’allele patologico e dal mantenimento dell’espressione dell’allele wild-type. La specificità a livello trascrittomico degli RTI selezionati è stata confermata mediante RNA-seq, dimostrando una deregolazione genica off-target minima. In conclusione, abbiamo dimostrato che l’editing epigenetico può silenziare in modo efficace e duraturo l’espressione di HTT, sia in modalità bialelica sia mediante targeting selettivo dell’allele patologico, aprendo la strada a ulteriori studi in vivo. In quest’ottica, stiamo attualmente ottimizzando sistemi di somministrazione transitoria per l’espressione in vivo degli RTI, al fine di valutarne sicurezza, efficacia e durata in modelli di HD.

Prodotti della Ricerca (correlati al progetto):

Elenco pubblicazioni su riviste indicizzate e brevetti

- Migliara A, Cappelluti MA, Giannese F, Valsoni S, Coglot A, Merelli I, Cittaro D, Lombardo A In Vitro Selection of Engineered Transcriptional Repressors for Targeted Epigenetic Silencing J Vis Exp. 2023 May 5;(195). DOI: 10.3791/64403.

- Cappelluti MA, Mollica Poeta V, Valsoni S, Quarato P, Merlin S, Merelli I, Lombardo A Durable and efficient gene silencing in vivo by hit-and-run epigenome editing Nature. 2024 Mar;627(8003):416-423. DOI: 10.1038/s41586-024-07087-8.
- Tremblay F, Xiong Q, Shah SS, Ko CW, Kelly K, Morrison MS, Giancarlo C, Ramirez RN, Hildebrand EM, Voytek SB, El Sebae GK, Wright SH, Lofgren L, Clarkson S, Waters C, Linder SJ, Liu S, Eom T, Parikh S, Weber Y, Martinez S, Malyala P, Abubucker S, Friedland AE, Maeder ML, Lombardo A, Myer VE, Jaffe AB. A potent epigenetic editor targeting human PCSK9 for durable reduction of low-density lipoprotein cholesterol levels. Nature Medicine. 2025 Apr;31(4):1329-1338. DOI: 10.1038/s41591-025-03508-x
- Brevetti: PCT/EP2022/052372; PCT/US2023/026088; PCT/US2023/74931; PCT/US2024/029529; US provisional 63/693,614; US provisional 63/693,599; EP24194393; US provisionals 63/661,482 e 63/711,567

Data inizio progetto: 01/01/2022

Data fine progetto: 31/12/2024

Data proroga: 31/12/2025

Valore progetto: 205.645,00

Valori economici:

Personale - Quota sostenuta alla data di rendicontazione: 94.430,00

Materiali di consumo - Quota sostenuta alla data di rendicontazione: 111.215,00

Totale complessivo quota 5 per mille progetto euro 205.645,00



Ministero della Salute – Direzione Generale della Ricerca e dell’Innovazione in Sanità

Fondi 5 per mille ANNO 2022

Abstract ed elenco pubblicazioni scientifiche

Ente della Ricerca Sanitaria Denominazione Ente: Fondazione Telethon Etss

Codice fiscale: 04879781005

Sede legale: Via Varese 16b – 00185 Roma

Indirizzo di posta elettronica dell'ente: direzione.generale@telethon.legalmail.it

Dati del rappresentante legale delegato: Luca Cordero di Montezemolo

Titolo del progetto: AG_Gritti A. Utilizzo di nuove piattaforme di terapia genica e modelli pre-clinici umani per comprendere la biologia e migliorare il trattamento di malattie genetiche neurodegenerative e demielinizzanti

Abstract dei risultati ottenuti

Il nostro obiettivo principale è migliorare l'efficacia delle strategie di terapia genica (GT) per le leucodistrofie (MLD, GLD) e la gangliosidosi GM2, malattie genetiche rare che coinvolgono il sistema nervoso centrale e periferico (CNS, PNS), dovute a una carenza di uno specifico enzima lisosomiale (Arilsulfatasi A in MLD, beta-galattocerebrosidasi in GLD, beta-esosaminidasi in GM2 gangliosidosi) (**Area 1**), e sviluppare modelli cellulari umani rilevanti per studiare i meccanismi della malattia e della correzione terapeutica (**Area 2**).

Area 1. Potenziare gli approcci di terapia genica ex vivo con HSC (HSC-GT) per GLD e gangliosidosi GM2. Le attività mirano a sviluppare nuovi vettori e costrutti che assicurino l'espressione soprafisiologica dell'enzima nelle cellule effettrici, una maggiore biodisponibilità del transgene e una correzione metabolica più efficiente nelle cellule carenti di enzima, in particolare nel sistema nervoso centrale e periferico.

Per MLD abbiamo dimostrato la cross-correzione mieloide-neurale utilizzando cellule di pazienti trattati con HSC-GT (cellule donatrici di enzima funzionale) e cellule neuronali e gliali derivate da cellule pluripotenti di paziente (cellule riceventi, con carenza di enzima) (vedi Area 2), chiarendo i meccanismi del beneficio terapeutico di questo approccio rispetto al trapianto di cellule staminali ematopoietiche (HSCT). Un manoscritto è in fase di revisione (V. Meneghini*, ..., L. Naldini, A. Aiuti, **A. Gritti**. *Neural Cell Cross-Correction in Autologous Hematopoietic Stem Cell Gene Therapy for Metachromatic Leukodystrophy*, in seconda revisione a NEJM).

Per GLD, abbiamo dimostrato - tramite esperimenti in vitro su cellule murine e umane e xenotrapianti - un aumento della biodisponibilità e della distribuzione tissutale (incluso nel CNS e nel PNS) di un enzima beta-galattocerebrosidasi chimerico nel contesto di HSC-GT in un modello murino severo. Abbiamo inoltre dimostrato la cross-correzione mieloide-neurale in questo modello, in vitro ed in vivo (2, 3).

Per la gangliosidosi GM2, abbiamo dimostrato i benefici terapeutici di una strategia combinata in un modello murino (4). Abbiamo inoltre definito il vantaggio della HSC-GT con un vettore lentivirale bicistronico ottimizzato per favorire la ricostituzione di beta-esosaminidasi, la correzione metabolica e la riduzione della patologia in due modelli murini e in cellule umane derivate da pazienti. Infine, abbiamo dimostrato la cross-correzione mieloide-neurale in questo modello, in vitro ed in vivo. Un manoscritto è in preparazione (F. Ornaghi, ..., S. Martino, M. Degano, **A. Gritti**. *Enhanced therapeutic efficacy of HSC gene therapy in GM2 gangliosidoses using bicistronic lentiviral vectors with optimized HEXA and HEXB gene expression*).

Area 2. Modellare i meccanismi delle malattie demielinizzanti e trattarle mediante modelli basati su cellule pluripotenti indotte umane (hiPSC). Le attività mirano a perfezionare sistemi basati su hiPSC per creare piattaforme e prodotti cellulari rilevanti per lo studio e il trattamento malattie genetiche neurodegenerative e demielinizzanti. Abbiamo ottimizzato le condizioni di coltura, i processi di trasduzione, i protocolli di differenziazione in neuroni e glia e di trapianto intracerebrale di iPSC derivate da pazienti (GLD, MLD, GM2 gangliosidosi) e da donatori sani. Ciò ci permette di ottenere culture arricchite con progenitori neurali, neuroni, astrociti e oligodendrociti in colture 2D e in organoidi tridimensionali arricchiti di oligodendrociti, utilizzati per studiare i meccanismi patologici, valutare approcci di terapia cellulare e indagare i meccanismi di risposta immunitaria ai vettori (5-9).

Abbiamo dimostrato che i progenitori neurali derivati da hiPSC presentano caratteristiche di glia radiale, condividono pattern molecolari e funzionali con le hNSC fetali somatiche, e differenziano preferenzialmente in cellule gliali dopo il trapianto intracerebrale neonatale in topi immunodeficienti (10). Stiamo esaminando se questi

progenitori neurali ingegnerizzati, in grado di esprimere quattro geni terapeutici contemporaneamente, possano favorire la maturazione degli oligodendrociti, l'immunomodulazione e la neuroprotezione. Questo metodo mira a creare un prodotto cellulare migliorato per il suo impiego terapeutico nelle malattie demielinizzanti

Prodotti della Ricerca (correlati al progetto):

Elenco pubblicazioni su riviste indicizzate

1. Cascino, F., Ricca, A., Picciotti, I., Valeri, E., Unali, G., Saporito, V., Freschi, M., Morena, F., Martino, S., Kajaste-Rudnitski, A., and **Gritti, A.** (2025). Chimeric enzymes enhance treatment potential for globoid cell leukodystrophy through hematopoietic stem cell gene therapy. *Mol. Ther.* **33**(12):6226–6247. <https://doi.org/10.1016/j.ymthe.2025.09.030>
 2. Ricca, A., Cascino, F., and **Gritti, A.** (2022). Isolation and culture of neural stem/progenitor cells from the postnatal periventricular region. *Methods Mol. Biol.* **2389**:11–31. https://doi.org/10.1007/978-1-0716-1783-0_2
 3. Sala, D., Ornaghi, F., Morena, F., Argentati, C., Valsecchi, M., Alberizzi, V., Di Guardo, R., Bolino, A., Aureli, M., Martino, S., and **Gritti, A.** (2022). Therapeutic advantages of combined gene/cell therapy strategies in a murine model of GM2 gangliosidosis. *Mol. Ther. Methods Clin. Dev.* **25**:170–189. <https://doi.org/10.1016/j.omtm.2022.03.011>
 4. Mangiameli, E., Freschi, M., Luciani, M., and **Gritti, A.** (2022). Generation of neuronal/glial mixed cultures from human induced pluripotent stem cells (hiPSCs). *Methods Cell Biol.* **171**:229–245. <https://doi.org/10.1016/bs.mcb.2022.04.012>
 5. Mangiameli, E., Cecchele, A., Morena, F., Sanvito, F., Matafora, V., Cattaneo, A., Della Volpe, L., Gnani, D., Paulis, M., Susani, L., Martino, S., Di Micco, R., Bachi, A., and **Gritti, A.** (2021). Human iPSC-based neurodevelopmental models of globoid cell leukodystrophy uncover patient- and cell type-specific disease phenotypes. *Stem Cell Reports* **16**(6):1478–1495. <https://doi.org/10.1016/j.stemcr.2021.04.011>
 6. Giordano, A.M.S., Luciani, M., Gatto, F., Abou Alezz, M., Beghè, C., Della Volpe, L., Migliara, A., Valsoni, S., Genua, M., Dzieciatkowska, M., Frati, G., Tahraoui-Bories, J., Giliani, S.C., Orcesi, S., Fazzi, E., Ostuni, R., D'Alessandro, A., Di Micco, R., Merelli, I., Lombardo, A., Reijns, M.A.M., Gromak, N., **Gritti, A.**, and Kajaste-Rudnitski, A. (2022). DNA damage contributes to neurotoxic inflammation in Aicardi–Goutières syndrome astrocytes. *J. Exp. Med.* **219**(4):e20211121. <https://doi.org/10.1084/jem.20211121>
 7. Luciani, M., Garsia, C., Mangiameli, E., Meneghini, V., and **Gritti, A.** (2022). Intracerebroventricular transplantation of human iPSC-derived neural stem cells (hiPSC-NSCs) into neonatal mice. *Methods Cell Biol.* **171**:127–147. <https://doi.org/10.1016/bs.mcb.2022.04.007>
 8. Costa-Verdera, H., Meneghini, V., Fitzpatrick, Z., Abou Alezz, M., Fabyanic, E., Huang, X., Dzhashiashvili, Y., Ahiya, A., Mangiameli, E., Valeri, E., Crivicich, G., Piccolo, S., Cuccovillo, I., Caccia, R., Chan, Y.K., Bertin, B., Ronzitti, G., Engel, E.A., Merelli, I., Mingozzi, F., **Gritti, A.**, Kuranda, K., and Kajaste-Rudnitski, A. (2025). AAV vectors trigger DNA damage response-dependent pro-inflammatory signalling in human iPSC-derived CNS models and mouse brain. *Nat. Commun.* **16**(1):3694. <https://doi.org/10.1038/s41467-025-58778-3>
- Luciani, M., Garsia, C., Beretta, S., Cifola, I., Peano, C., Merelli, I., Petiti, L., Miccio, A., Meneghini, V., and **Gritti, A.** (2024). Human iPSC-derived neural stem cells displaying radial glia signature exhibit long-term safety in mice. *Nat. Commun.* **15**(1):9433. <https://doi.org/10.1038/s41467-024-53613-7>

Data inizio progetto: 01/01/2022

Data fine progetto: 31/12/2024

Data proroga: 31/12/2025

Valore progetto: 223.329,00

Valori economici:

Personale - Quota sostenuta alla data di rendicontazione: 151.464,00

Materiali di consumo - Quota sostenuta alla data di rendicontazione: 71.865,00

Totale complessivo quota 5 per mille progetto euro 223.329,00