

Rendicontazione 5 per mille Anno 2023 Ministero della Salute

Codice	Titolo / Istituto	Data inizio	Data fine	Finanziamento assegnato
5M-2023-23683252	5 per mille generico per com... (TELETHON)			99.999.999.999,00
5M-2023-23687603	MEB_Development of a tech... (TELETHON)	01/01/2023	31/12/2025	32.949,12
5M-2023-23687604	AC_Investigating liver tissue ... (TELETHON)	01/01/2023	31/12/2025	174.042,37
5M-2023-23687605	AA_Human Hematopoietic St... (TELETHON)	01/01/2023	31/12/2025	54.207,57
5M-2023-23687606	AG_Gritti A._Utilizzo di nuov... (TELETHON)	01/01/2022	31/12/2025	133.010,78
5M-2023-23687607	AM_Mortellaro A._Studio dell... (TELETHON)	01/01/2022	31/12/2025	143.048,66
5M-2023-23687608	GF_Ferrari G._Comprensione... (TELETHON)	01/01/2022	31/12/2025	256.358,21
5M-2023-23687609	AV_Villa A._Analisi della funz... (TELETHON)	01/01/2022	31/12/2025	93.875,24
5M-2023-23687610	AL_Lombardo A._Sviluppo di... (TELETHON)	01/01/2022	31/12/2025	183.981,13



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

Fondi 5 per mille ANNO 2023

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: MEB_Development of a technological platform to study the pathophysiological mechanisms of skeletal damage and the impact of ex-vivo gene therapy in MPSIH and in other LSDs with skeletal involvement

Abstract dei risultati ottenuti:

The severe dysostosis multiplex that affects Mucopolysaccharidosis type I-Hurler (MPSIH) patients was stabilized in 8 patients treated in a phase I/II clinical trial (NCT03488394) of hematopoietic stem cell gene therapy (HSC-GT).

As the molecular mechanisms underlying skeletal damage and cross-correction are not fully elucidated, we investigated the key skeletal players in MPSIH patients enrolled in the phase I/II clinical trial (NCT03488394) of hematopoietic stem cell gene therapy (HSC-GT), before and after treatment. Patients bone marrow (BM) biopsies were also investigated, together with a deep characterization of the skeletal disease in the MPSI murine model.

Although the in vitro characterization of patient-derived osteoclasts (OCs) and mesenchymal stromal cells (MSCs) did not show any alterations, during the intramembranous ossification patient-derived osteoblasts (OBs) showed intracellular glycosaminoglycans accumulation, that was rescued by the cross-correction mechanism via transduced OCs. Patient-derived chondrogenic pellets (CHPs) showed an altered endochondral ossification process in vivo as suggested by their reduced capability to develop bone ossicles after in vivo implantation. Patients BM biopsies showed vacuolation of the enthesis tissue which was completely rescued after HSC-GT. A deep analysis of the skeletal disease and correction in the MPSI immunocompetent murine model after with HSC-GT indicates histological and histomorphometry improvements. These findings obtained in patient's and murine models confirm a beneficial effect of HSC-GT on MPSIH typical skeletal disease features and support the use of HSC-GT in this disease setting.

The technological platform based on 2D and 3D models (replicating both intramembranous and endochondral ossification) constitutes a key tool to elucidate pathological and correction mechanisms also in the platform skeletal LSD. We have so far applied the same methods and models to skeletal cell obtained from one MPSIVA patient.

Prodotti della Ricerca (correlati al progetto):

Elenco pubblicazioni su riviste indicizzate

- Santi L, Crippa C, Capo V, ...Villa A, **Bernardo ME**. Ex vivo lentiviral-based gene therapy in Mucopolysaccharidosis type I-Hurler: focus on skeletal damage and cross-correction mechanisms. *Manuscript planned for submission in January 2026*
- This work has been selected for oral presentations at several international meetings of gene therapy and bone research in 2025: ASGCT, ESGCT, European Calcified Tissue Society (ECTS), American Society for Bone Mineral Research (ASBMR) and has received 2 prizes as best abstract at ECTS and ASBMR.

Data inizio progetto: 01/01/2023

Data fine progetto: 31/12/2025

Valore progetto: 32.949,12

Valori economici:

Personale - Quota sostenuta alla data di rendicontazione: 32.949,12

Materiali di consumo - Quota sostenuta alla data di rendicontazione: 0

Totale complessivo quota 5 per mille progetto euro 32.949,12



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

Fondi 5 per mille ANNO 2023

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: Investigating liver tissue dynamics to improve the efficiency and durability of gene therapy for inherited liver metabolic diseases

Abstract dei risultati ottenuti:

Hepatocytes are the liver's main functional cells and are key targets for in vivo gene therapy to treat monogenic diseases. Integrating the transgene into the genome is critical for long-term expression from a single early-life dose, which is achievable via integrating vectors or genome editing. To ensure persistence through liver growth and cell turnover, it is also necessary to target the hepatocytes driving these processes. While liver regeneration and homeostasis have been studied extensively, hepatocyte growth and maturation remain less well understood. Here, we investigate how hepatocyte heterogeneity evolves during liver growth and its implications for in vivo gene engineering. We performed clonal tracing, as well as single-cell and spatial transcriptomics, on mouse livers of various ages. We evaluated the efficiency, stability, and lobule distribution of lentiviral gene transfer and targeted transgene integration. We found that a subset of clonogenic hepatocytes (15-20%) in the newborn liver generates >90% of the adult tissue and co-localizes with hematopoietic islands within a spatial niche. Preferential gene editing of these clonogenic hepatocytes resulted in an increased proportion of the gene-engineered liver area, supporting their role in liver growth. Age-dependent hepatocellular heterogeneity affected the efficiency of lentiviral gene delivery in vivo and its distribution throughout the hepatic lobule. The gradual establishment of metabolic zonation after weaning and elevated proteasome activity in the peri-central area in adults influenced the observed age-related outcomes. These insights into spatiotemporal hepatocyte dynamics enhance our understanding of liver biology and have important implications for therapeutic strategies.

In vivo gene therapy to the liver using lentiviral vectors (LV) may represent a one-and-done therapeutic approach for monogenic diseases. Increasing LV gene therapy potency is crucial for reducing the effective doses, thus alleviating dose-dependent toxicities and facilitating manufacturing. LV-mediated liver transduction may be enhanced by positively selecting LV-transduced hepatocytes after treatment (a posteriori) or by augmenting the initial fraction of LV-targeted hepatocytes (a priori). Here, we successfully enhanced hepatocyte transduction in mice by transiently inhibiting antiviral pathways and/or through a fasting regimen. The most promising transduction-enhancer combination synergized with phagocytosis-shielded LV, resulting in a remarkable 40-fold increase in transgene output. Overall, our work highlights the potential of minimally invasive, cost-effective treatments capable of improving the potency of in vivo LV gene therapy to hepatocytes, in order to expand its applicability and ease clinical translation.

Progressive familial intrahepatic cholestasis type 2 (PFIC2) is a monogenic inherited metabolic disease caused by the deficiency of the bile salt export pump (BSEP), a transporter of bile acids (BA) across the canalicular membrane of hepatocytes, encoded by the ABCB11 gene. PFIC2 patients display jaundice and cholestasis and develop liver fibrosis and end-stage liver disease before adulthood. Current treatments include pharmacological or surgical interventions to decrease BA blood concentration, and liver transplantation as the only curative option. Early intervention would be fundamental in diseases like PFIC2, presenting early onset and rapid progression, to limit hepatic damage. Since BA levels and other stimuli tightly regulate ABCB11 expression, we are developing a liver-directed CRISPR-Cas9-based genome editing approach to integrate the corrective cDNA into the first intron of the ABCB11 gene. This strategy may allow stable correction of most disease-causing mutations while maintaining physiological gene regulation. We initially assessed lentiviral vector (LV)-mediated liver gene addition in *Abcb11*^{-/-} mice, a PFIC2 model, to correlate

therapeutic effects with the extent of liver transduction. We administered 2-week-old Abcb11^{-/-} mice with LV encoding the murine Abcb11 transgene under the control of a hepatocyte-specific cassette. We observed that transgene mRNA levels of about 30% of the endogenous murine BSEP resulted in a significant decrease, up to normalization, of serum BA and bilirubin until 6 months of age, indicating prevention of cholestatic damage. Towards genome editing, we tested in 2-week-old wild-type (WT) mice the delivery of AAV-carrying donor DNA, followed by the administration of lipid nanoparticles (LNP) carrying Cas9 mRNA and gRNA at the same time, 48 hours later, or 1 week later. We found that the coadministration of AAV and LNP results in the highest integration rate (up to 18%) and mCherry-positive liver area (up to 13%). The mCherry expression in treated mice was comparable to the BSEP expression obtained with the therapeutic LV gene transfer. Overall, this study informs about the optimal strategy for in vivo liver-directed genome editing and represents a first step towards site-specific, durable gene correction of PFIC2 and conceivably other inherited metabolic diseases.

Prodotti della Ricerca (correlati al progetto):

Elenco pubblicazioni su riviste indicizzate

Original Research Articles

Canepari C, Milani M, Degl'Innocenti S, Monti M, Volpin M, Starinieri F, Cavallo M, Fabiano M, Biffi M, Longo M, Russo F, Ormoli L, Gazzo F, Norata R, Rocchi M, Brombin C, Cugnata F, Cristofori P, Beretta S, Montini E, Sanvito F, **Cantore A**. Tweaking lentiviral vector design balances efficacy and safety in liver-directed gene therapy for familial hypercholesterolemia. **Mol Ther**. In press.

Milani M, Starinieri F, Beretta S, Monti M, Canepari C, Marabotti F, Zambrano S, Mazza D, Fabiano A, Simoni C, Cammarota E, Volpin M, Bortolussi M, Russo F, Biffi M, Genua M, Degl'Innocenti S, Sanvito F, Ostuni R, Muro A, Montini E, Moalli F, Iannacone M, Merelli I, **Cantore A**. Spatiotemporal liver dynamics shape hepatocellular heterogeneity and impact in vivo gene engineering. **J Hepatol**. 2025 Dec;83(6):1392-1409. PMID: 40617259

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 May 28. PMID: 40437086

*Co-last authors.

Canepari C, Milani M, Simoni C, Starinieri F, Volpin M, Fabiano A, Biffi M, Russo F, Norata R, Rocchi M, Brombin C, Cugnata F, Montini E, Sanvito F, Grompe M, **Cantore A**. Enhancing the potency of in vivo lentiviral vector mediated gene therapy to hepatocytes. **Nat Commun**. 2025 May 23;16(1):4802. PMID: 40410162

Simoni C, Nozi J, Starinieri F, La Bella T, Manta E, Negri C, Biffi M, Norata R, Rocchi M, Sanvito F, Ronzitti G, Barbon E, **Cantore A**. Liver fibrosis negatively impacts in vivo gene transfer to hepatocytes. **Nat Commun**. 2025 Mar 10;16(1):2119. PMID: 40064848

Milani M, Starinieri F, Beretta S, Fabiano A, Plati T, Canepari C, Biffi M, Russo F, Norata R, Sanvito F, Merelli I, Aloia L, Huch M, Naldini L, **Cantore A**. Identification of hepatocyte-primed cholangiocytes in homeostatic liver by lentiviral gene transfer to mice and non-human primates. **Cell Reports**. 2025 Mar 25;44(3):115341. PMID: 39998949

Milani M, Canepari C, Assanelli S, Merlin S, Borroni E, Starinieri F, Biffi M, Russo F, Fabiano A, Zambroni D, Annoni A, Naldini L, Follenzi A, **Cantore A**. GP64-pseudotyped lentiviral vectors target liver endothelial cells and correct hemophilia A mice. **EMBO Mol Med**. 2024 Jun;16(6):1427-1450. PMID: 38684862

Review Articles

Thornburg CD, Pipe SW, **Cantore A**, Unzu C, Jones M, Miesbach WA. Clinical perspective: Advancing hemophilia treatment through gene therapy approaches. **Mol Ther**. 2025 Jun 4;33(6):2350-2362. PMID: 40263938.

Simoni C, Barbon E, Muro AF, **Cantore A**. In vivo liver targeted genome editing as therapeutic approach: progresses and challenges. **Front Genome Ed**. 2024 Aug 23;6:1458037. PMID: 39246827

Canepari, **Cantore A**. Gene transfer and genome editing for familial hypercholesterolemia. **Front Mol Med** 2023 3:1140997. doi: 10.3389/fmmed.2023.1140997

Data inizio progetto: 01/01/2023

Data fine progetto: 31/12/2025

Valore progetto: 174.042,37

Valori economici:

Personale - Quota sostenuta alla data di rendicontazione: 29.363,67

Materiali di consumo - Quota sostenuta alla data di rendicontazione: 144.678,70

Totale complessivo quota 5 per mille progetto euro 174.042,37



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

Fondi 5 per mille ANNO 2023

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: AA_Human Hematopoietic Stem/Progenitor cell trafficking and clonal tracking

Abstract dei risultati ottenuti:

Le cellule staminali ematopoietiche (CSE) umane sono state utilizzate con successo nella terapia genica (TG) ex vivo per il trattamento di patologie genetiche o acquisite. Il recupero e l'analisi longitudinale dei siti di integrazione del vettore, a partire da campioni di sangue periferico (SP) e midollo osseo (MO) di pazienti sottoposti a GT con CSE, sono stati fondamentali per monitorare sia la sicurezza sia l'efficacia del trattamento di terapia genica, oltre che per studiare le dinamiche delle HSPC in vivo nell'uomo. Nel corso degli anni, abbiamo applicato la nostra analisi combinatoria, che include sia la caratterizzazione fenotipica e funzionale sia il tracciamento clonale basato sui siti di integrazione, per svelare il destino di distinte sottopopolazioni di CSE dopo la GT. Il nostro lavoro ha dimostrato la presenza costante e duratura di CSE geneticamente corrette con potenziale di differenziamento in tutti i lineages ematopoietici (Calabria et al. Nature 2024). Inoltre, abbiamo correlato la quantità di CSE primitive presenti nel prodotto cellulare infuso con il chimerismo a lungo termine delle cellule trasdotte nel MO, dimostrando che, una volta attecchite, le CSE primitive mostrano proprietà funzionali simili indipendentemente dalla loro fonte (MO o sangue periferico mobilizzato) (Scala et al Nat Comm 2023). Inoltre, in uno studio recente, abbiamo associato l'attivazione di programmi di senescenza allo stress proliferativo imposto dal trapianto di un numero ridotto di CSE (Lettera et al JEM 2025). Le informazioni sulle dinamiche in vivo delle CSE nei pazienti sottoposti a TG consentono di studiare il ricircolo delle CSE in vivo nell'uomo. Abbiamo osservato che le CSE circolanti (cCSE) primitive sono in grado di muoversi tra diverse nicchie del MO e partecipano attivamente alla produzione ematopoietica. Inoltre, abbiamo scoperto che i progenitori multi-linfoidi circolanti sono predisposti al colonizzare il timo e contribuiscono alla produzione di cellule T in vivo (Quaranta et al Blood 2024). Analizzando campioni di soggetti sani appartenenti a diverse fasce d'età, abbiamo osservato che le cCSE sono aumentate in numero e arricchite in sottopopolazioni primitive nei lattanti (0–6 mesi di età). Il ricircolo elevato delle CSE nei neonati è stato osservato anche nei modelli murini e questo fenomeno ha consentito di individuare una finestra temporale ideale per lo sviluppo di approcci di TG in vivo che hanno come bersaglio le CSE. Infatti, la somministrazione di vettori lentivirali direttamente in topi neonati è riuscita a correggere il fenotipo patologico in 3 modelli murini di malattia, tra cui anche l'immunodeficienza primitiva dovuta a deficit dell'enzima adenosina deaminasi (ADA-SCID) (Milani et al. Nature 2025). Per aumentare la disponibilità di CSE in circolo, abbiamo anche riprodotto nei topi il protocollo clinico di mobilizzazione, dimostrando che esso consente una maggiore trasduzione delle CSE in vivo. Nel complesso, il nostro progetto ha fornito informazioni chiave sulla biologia delle CSE dopo terapia genica e sulle proprietà del loro ricircolo, che hanno portato a spunti fondamentali per lo sviluppo di nuovi approcci di terapia genica sempre più innovativi.

Prodotti della Ricerca (correlati al progetto):

Elenco pubblicazioni su riviste indicizzate

- ***Expanded circulating hematopoietic stem/progenitor cells as novel cell source for the treatment of TCIRG1 osteopetrosis.*** Capo V et al. (Haematologica 2021).
- ***Hematopoietic reconstitution dynamics of mobilized- and bone marrow-derived human hematopoietic stem cells after gene therapy.*** S. Scala et al. (Nature Communication 2023).
- ***Circulating hematopoietic stem/progenitor cell subsets contribute to human hematopoietic homeostasis.*** Quaranta et al (Blood 2024).
- ***Long-term lineage commitment in haematopoietic stem cell gene therapy.*** A Calabria et al (Nature 2024).
- ***In vivo haematopoietic stem cell gene therapy enabled by postnatal trafficking.*** M Milani et al. (Nature 2025).

- ***Molecular and phenotypic blueprint of the hematopoietic compartment reveals proliferation stress as a driver of age-associated human stem cell dysfunctions.*** E Lettera et al (JEM 2025).
- ***Biological properties of HSC: Scientific basis for HSCT.*** Aiuti A, Scala S, Chabannon C. The EBMT Handbook: Hematopoietic Stem Cell Transplantation and Cellular Therapies, 2024

Data inizio progetto: 01/01/2023

Data fine progetto: 31/12/2025

Valore progetto: 54.207,57

Valori economici:

Personale - Quota sostenuta alla data di rendicontazione: 54.207,57

Materiali di consumo - Quota sostenuta alla data di rendicontazione: 0

Totale complessivo quota 5 per mille progetto euro 54.207,57

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

Fondi 5 per mille ANNO 2023

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 (Arlsulfatasi 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., Dzhashvili, 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: 31/12/2025

Valore progetto: 133.010,78

Valori economici:

Personale - Quota sostenuta alla data di rendicontazione: 74.925,12

Materiali di consumo - Quota sostenuta alla data di rendicontazione: 58.085,66

Totale complessivo quota 5 per mille progetto euro:133.010,78



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

Fondi 5 per mille ANNO 2023

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 rappresenta 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, Marktel 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: 31/12/2025

Valore progetto: 143.048,66

Valori economici:

Personale - Quota sostenuta alla data di rendicontazione: 118.014,91

Materiali di consumo - Quota sostenuta alla data di rendicontazione: 25.033,75

Totale complessivo quota 5 per mille progetto euro 143.048,66



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

Fondi 5 per mille ANNO 2023

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: 31/12/2025

Valore progetto: 256.358,21

Valori economici:

Personale - Quota sostenuta alla data di rendicontazione: 135.073,78

Materiali di consumo - Quota sostenuta alla data di rendicontazione: 121.284,43

Totale complessivo quota 5 per mille progetto euro 256.358,21



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

Fondi 5 per mille ANNO 2023

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 stati 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 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: 31/12/2025

Valore progetto: 93.875,24

Valori economici:

Personale - Quota sostenuta alla data di rendicontazione: 57.845,66

Materiali di consumo - Quota sostenuta alla data di rendicontazione: 36.029,58

Totale complessivo quota 5 per mille progetto euro 93.875,24



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

Fondi 5 per mille ANNO 2023

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 biallelico 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 biallelica, 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 biallelica 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: 31/12/2025

Valore progetto: 183.981,13

Valori economici:

Personale - Quota sostenuta alla data di rendicontazione: 124.647,59

Materiali di consumo - Quota sostenuta alla data di rendicontazione: 59.333,54

Totale complessivo quota 5 per mille progetto euro 183.981,13