

## DIPARTIMENTO DI EMATOLOGIA, ONCOLOGIA E MEDICINA MOLECOLARE

Il Dipartimento di Ematologia, Oncologia e Medicina Molecolare (EOMM) svolge attività di ricerca principalmente nel campo dei tumori, delle malattie del sangue e delle cellule staminali, come anche in alcune aree della genetica e della medicina cardiovascolare. La ricerca svolta all'interno del Dipartimento è mirata a comprendere i meccanismi che controllano la crescita, la maturazione e la morte cellulare in condizioni normali e nel corso di malattie. Durante queste ricerche una speciale attenzione è rivolta allo sviluppo di nuovi marcatori diagnostici e terapie e farmaci innovativi, aspetti particolarmente importanti nel caso delle malattie oncologiche e ematologiche a causa della loro diffusione e elevato impatto socio-economico e sanitario.

Nel Dipartimento medici e biologi lavorano fianco a fianco per comprendere i processi che portano le cellule staminali a formare cellule mature specializzate, come quelle che formano il sangue, i muscoli e il sistema nervoso. Infatti, la comprensione di questi processi potrà portare in futuro ad utilizzare le cellule staminali per riparare i tessuti danneggiati o per sostituire organi colpiti da malattie. Nel campo delle cellule staminali una particolare area di ricerca è rappresentata dallo studio delle cellule staminali neoplastiche, che sono state recentemente indicate come responsabili dello sviluppo dei tumori e della resistenza alle terapie antineoplastiche. Le ricerche in atto includono anche studi di validazione di biomarcatori predittivi di risposta, consistenti nell'analisi della risposta alle *targeted therapies* in relazione al profilo molecolare dei tumori di origine, per individuare una relazione fra la responsività alla terapia e lo stato di attivazione di alcune molecole chiave, individuate come potenziali biomarcatori. Altri progetti di ricerca all'interno del Dipartimento sono dedicati allo studio delle nefropatie e di malattie genetiche rare, quali le talassemie, le malattie lisosomiali e la sindrome di Noonan. Alcuni progetti saranno finalizzati all'identificazione dei geni-malattia coinvolti in un ampio gruppo di malattie rare (displasie scheletriche, sindromi malformative e malattie neurodegenerative) utilizzando approcci genomici (sequenziamento dell'esoma e del trascrittoma).

Un importante settore di ricerca è costituito dalla genomica e dai microRNA, piccoli geni non codificanti che inibiscono la sintesi di specifiche proteine e che sono alla base di numerosissimi processi fisiologici e patologici.

Nel Dipartimento sono di recente confluiti gruppi di ricerca provenienti dal Dipartimento di Biologia Cellulare e Neuroscienze impegnati in studi di immunoregolazione, con particolare riferimento al ruolo di citochine e chemochine nella risposta immune innata e acquisita, di immunologia dei tumori e immunoterapia sperimentale e clinica.

Il Dipartimento è quindi ora ulteriormente impegnato nello sviluppo di diverse tipologie di modelli murini rilevanti per studi di patogenesi e terapia delle malattie umane, con particolare riferimento ai tumori.

Inoltre, il Dipartimento è anche direttamente coinvolto nel coordinamento di studi clinici di fase I e di fase II in pazienti con melanoma basati su protocolli derivanti dalle ricerche condotte in Istituto in questi ultimi anni, utilizzando vaccini tumorali o farmaci cellulari (prodotti dell'Officina Farmaceutica "Farmaci Biologici Cellulari" – FaBioCell), da soli o in combinazione con chemioterapia.

Il Dipartimento funge da centro di coordinamento di Programmi di ricerca nazionali e di collaborazione internazionale, che comprendono unità operative intra- e extramurali: in particolare, il Programma Oncotecnologico e quello Italia-USA sulla Oncoproteomica.

Il Dipartimento coordina inoltre il Gruppo Interdipartimentale di Oncologia (GIO) dell'ISS, interagendo con la rete degli IRCCS oncologici di Alleanza contro il Cancro (ACC) e svolgendo attività di supporto alla rete stessa. In aggiunta, il Dipartimento svolge un'importante attività di supporto tecnico-scientifico al Ministero della Salute per la gestione del progetto TRANSCAN (Ricerca traslazionale in Oncologia), che rappresenta il primo ERA-net nell'area della ricerca biomedica coordinato dall'Italia. Il Dipartimento coordina il nodo nazionale per la partecipazione all'Infrastruttura di Ricerca Europea EATRIS e le attività di partecipazione dell'istituto alle altre infrastrutture di ricerca BBMRI e ECRIN.

Infine, il Dipartimento partecipa ad una serie di valutazioni di grande importanza per la sicurezza dei cittadini. Tra queste, ricordiamo le verifiche di qualità sugli emoderivati, la valutazione delle sperimentazioni cliniche sull'uomo con farmaci di nuova istituzione e il controllo delle nuove terapie nel settore emato-oncologico.

### **Resoconto attività 2014**

Le attività del Dipartimento del 2014 hanno registrato uno sviluppo importante delle principali linee di ricerca e di coordinamento di progetti nazionali e internazionali già in atto e la continuazione del costante impegno di parte del personale in attività di controllo e istituzionali tipiche della missione del dipartimento stesso. Aspetti rilevanti delle ricerche condotte nel 2014 hanno riguardato i seguenti temi: caratterizzazione di cellule staminali tumorali (CST) in diversi modelli e individuazione di inibitori e anticorpi monoclonali diretti contro tali cellule, anche mediante analisi fosfoproteomica delle vie di trasduzione dei segnali; caratterizzazione delle cellule staminali mesenchimali (CSM) presenti nell'intestino umano e dell'effetto positivo di CSM da cordone ombelicale nell'amplificazione dei progenitori ematopoietici *in vitro* e *in vivo*; studi riguardanti l'isolamento e l'amplificazione di cellule endoteliali da sangue di cordone ombelicale umano; studi di proteomica sui meccanismi di regolazione della crescita e diffusione metastatica del melanoma cutaneo; studi di correlazione malattia renale cronica/malattie cardiovascolari e sugli effetti di diverse tecniche emodialitiche sui livelli di vitamine antiossidanti; studi sui microRNA come potenziali marcatori diagnostici e bersagli terapeutici in tumori solidi (melanoma, glioblastoma e carcinoma del polmone e del colon) e come fattori chiave nel controllo dell'ematopoiesi e dell'eritropoiesi; messa a punto di metodologie per lo studio degli esosomi e del loro ruolo nei fenomeni di comunicazione intercellulare e quali potenziali marcatori diagnostici antitumorali; caratterizzazione del meccanismo d'azione di nuovi farmaci anti-tumorali; studi della relazione fra ematopoiesi e angiogenesi studiata in modelli sperimentali; identificazione di nuovi geni-malattia implicati nelle RASopatie e in altre malattie dello sviluppo e dei sottostanti meccanismi patogenetici; studi di oncogenomica diretti alla comprensione del significato biologico e della rilevanza clinica delle mutazioni somatiche di JAK3 nelle leucemie linfoblastiche acute e alla caratterizzazione dei profili mutazionali delle CST; studi rivolti alla comprensione dei meccanismi cellulari alla base dell'aumentata autofagia nella malattia di Gaucher; studi dei meccanismi molecolari e cellulari che regolano la risposta immunitaria e il ruolo di loro alterazioni nella patogenesi di alcune malattie infettive, neoplastiche, infiammatorie e autoimmuni; studi cellulari e molecolari su cellule dendritiche (DC) murine e umane finalizzate allo sviluppo di nuovi farmaci cellulari per l'immunoterapia dei tumori; sviluppo di modelli murini di topi knock-out, transgenici e/o immunodeficienti per studi di patogenesi di alcune malattie umane e di terapie innovative contro i tumori; sviluppo di strategie terapeutiche di chemio-immunoterapia in modelli di tumori murini; generazione di anticorpi monoclonali contro antigeni tumorali per lo sviluppo di kit diagnostici nel carcinoma del colon-retto; studi sui meccanismi molecolari alla base del sinergismo tra chemioterapia e immunoterapia in modelli murini e in pazienti con neoplasie ematologiche; identificazione di

nuovi biomarcatori immunologici e meccanismi molecolari immuno-mediati nella risposta ad agenti chemioterapici in modelli murini e nell'uomo. A queste attività di ricerca, si sono aggiunte quelle tese all'attivazione di studi clinici, quali la preparazione di farmaci cellulari all'officina farmaceutica FaBioCell (IFN-DC per uno studio di Fase I in pazienti con melanoma; cellule NK per il trattamento di pazienti con neoplasie ematologiche) e il coordinamento di studi clinici (studio di fase II per la valutazione dell'efficacia di un vaccino peptidico contro antigeni di melanoma in associazione a dacarbazina). Il Dipartimento ha fornito supporto ad alcune iniziative internazionali, quali il KIC sulle tematiche *Healthy Living and Active Aging* e ha svolto attività di consulenza e di formazione nell'ambito del progetto dal titolo "Omica e nanotecnologie applicative agli esseri viventi per la diagnostica delle malattie - ONEV", (Programma Operativo Nazionale "Ricerca & Competitività" 2007-2013).

Inoltre, il Dipartimento ha gestito progetti speciali di valenza nazionale e internazionale, quali il Programma Oncotecnologico, quello Italia-USA sulla Oncoproteomica, il progetto TRAIN co-finanziato dalla Commissione Europea per progetti di mobilità di giovani ricercatori nel settore dell'oncologia traslazionale, un progetto per l'accreditamento di sistemi di qualità degli IRCCS di ACC mediante il modello dell'OECD, e i progetti per lo sviluppo dei nodi nazionali per la Infrastrutture di Ricerca Europee EATRIS e BBMRI. Infine, il Dipartimento ha svolto diversi tipi di attività istituzionali, quali: i) verifiche di qualità e sicurezza sugli emoderivati; ii) valutazione delle sperimentazioni cliniche sull'uomo con farmaci di nuova istituzione e il controllo delle nuove terapie nel settore emato-oncologico; iii) controllo di stato di emoderivati prima dell'immissione in commercio, sorveglianza post-marketing e la farmacovigilanza di medicinali emoderivati; consulenza per l'SSN per la diagnosi di anemie ereditarie da difetto enzimatico e di membrana eritrocitaria; iv) aggiornamento del Registro Nazionale delle Coagulopatie Congenite.

## Descrizione dei Reparti

### Reparto Applicazioni cliniche delle terapie

Il Reparto di Applicazioni cliniche delle terapie biologiche nasce nell'aprile 2008 con l'intento di promuovere la ricerca e l'applicazione in ambito clinico di strategie terapeutiche basate sull'uso di prodotti biologici di nuova generazione. In particolare, il Reparto si occupa prevalentemente di immunoterapia dei tumori senza tralasciare le possibili implicazioni che gli sviluppi delle conoscenze in questo ambito potrebbero avere anche su altre patologie (infettive, degenerative o autoimmuni).

Lo scopo è di mettere a frutto le conoscenze precliniche e cliniche elaborate dai propri ricercatori e di collaborare con altre istituzioni di ricerca e con istituzioni cliniche per promuovere la realizzazione nell'uomo di nuovi protocolli terapeutici e valutarne gli effetti e l'efficacia. Le tematiche da sviluppare riguarderanno l'uso di citochine, di DC e di linfociti in combinazione o meno con agenti chemioterapici ed, eventualmente, altri farmaci, per potenziare le risposte immunitarie contro i tumori.

Il Reparto ha, inoltre, il compito specifico di mantenere costantemente aggiornate le conoscenze nel settore delle bioterapie sia attraverso un'attività di *horizon scanning* che di ricerca attiva in modelli animali e nell'uomo per disegnare, coordinare e monitorare studi clinici di immunoterapia e più in generale di bioterapia con il fine ultimo di fornire *proof of concept* per l'applicazione clinica di terapie biologiche.

Non ultimo, l'*expertise* dei ricercatori del Reparto sarà messo a disposizione dell'Istituto e dell'accademia per la comprensione e il superamento dei problemi tecnici e regolatori che rendono difficile l'applicazione e la diffusione delle bioterapie.

Il Reparto ha svolto le seguenti attività:

- Studi preclinici
  - Studio comparativo, mediante tecniche di *microarray*, del profilo dei messaggeri indotti da diversi agenti chemioterapici aventi o meno effetto promuovente la risposta immune antitumorale nel topo. Terminata la parte di valutazione degli effetti biologici *in vivo*, è stata ultimata la raccolta dei campioni di tessuto per l'estrazione degli mRNA ed è stata effettuata l'ibridazione sui *chip* per *microarray*. Sulla base dei dati risultanti dall'analisi bioinformatica si è deciso di procedere alla ulteriore valutazione di geni coinvolti nel sistema interferon.
  - Studi *in vitro* e *in vivo* su linea MCA205 e C57BL/6 per dimostrare il coinvolgimento del *pathway* dei recettori endosolici dell'IFN di tipo I e di TLR3 nella risposta alla terapia con antraci cline. Lo studio, in collaborazione con l'Institut Gustave Roussy, Villejuif, Francia, chiarisce il ruolo dell'interferon di tipo I nell'induzione di apoptosi immunogenica in modelli sperimentali murini. Il lavoro giunto a conclusione è stato pubblicato sulla rivista scientifica "Nature Medicine".
  - Caratterizzazione fenotipica e costruzione di anticorpi monoclonali verso l'antigene tumore associato COA-1 espresso nel carcinoma del colon-retto. Uno di questi anticorpi, saggiato su circa 300 tessuti tumorali (prevalentemente di CRC) mostra una reattività selettiva proponendosi come strumento di indagine diagnostica e prognostica per questo tipo di tumore. La ricerca mediante tecniche ELISA messe a punto ex novo della proteina nel siero effettuata su circa 150 pazienti con CRC e normali ha dato risultati positivi di correlazione con la malattia. Si sta procedendo alla comparazione della positività per anticorpi anti COA-1 e CEA in pazienti con CRC per una maggiore valutazione del valore predittivo-prognostico di questi marcatori.
  - Definizione del ruolo di IRF-1 nella mediazione dell'effetto antitumorale determinato dalla combinazione di chemio e immuno-terapia in modelli sperimentali murini. Lo studio ha dimostrato il coinvolgimento di IRF-1 nell'effetto immunoadiuvante della ciclofosfamida in combinazione con immunoterapia adottiva antitumorale. Lo studio, concluso, è in fase di pubblicazione.
  - Studio di strategie terapeutiche di chemio-immunoterapia in modelli murini di tumore spontaneo della mammella su topi transgenici Her2-NEU. Lo studio è in fase avanzata di completamento e i risultati mostrano come la chemioterapia sia in grado di rompere la tolleranza immunologica indotta dal tumore e rendere quest'ultimo sensibile al trattamento immunoterapico. Il modello sperimentale sarà utilizzato e validato come modello preclinico di *dose finding* e *combination effectiveness* per disegnare nuovi trial clinici.
  - Studio del microambiente tumorale con particolare riferimento al ruolo dei macrofagi associati al tumore (TAM) nella risposta anti-tumorale in modelli murini.
- Studi clinici
  - Studio di fase I/II per la valutazione dell'efficacia di un vaccino peptidico contro antigeni di melanoma in associazione a chemioterapia (Dacarbazina). La fase di preparazione dello studio si è conclusa. Il numero dei pazienti arruolati è arrivato a 34 e tutti i pazienti hanno terminato il ciclo completo di trattamento. L'arruolamento dei pazienti è stato temporaneamente interrotto per consentire una valutazione interinale dei risultati immunologici e clinici. Questi ultimi mostrano un significativo incremento del

periodo privo di malattia e del tempo totale di sopravvivenza. È in corso la stesura del rapporto scientifico per la pubblicazione su una rivista internazionale.

- Nell'ambito dello studio clinico di fase I di vaccinazione mediante inoculo intraliesionale di IFN-DC in pazienti con melanoma superficiale, svolto in collaborazione con il Reparto di Immunoterapia Sperimentale (EOMM), sono stati messi a punto ed eseguiti i test immunologici per la valutazione delle risposte antitumorali dei singoli pazienti.

## Reparto Biochimica e biologia molecolare clinica

Il Reparto ha svolto le seguenti attività:

### *Progetti di ricerca*

- Nell'ambito del progetto di ricerca CNS9 "Valutazione della storage lesion delle emazie portatrici di difetti congeniti del globulo rosso: il deficit enzimatico di glucosio-6-fosfato deidrogenasi (G6PD) e il trait sferocitico", sono continuati gli studi sulle modificazioni delle proprietà reologiche e della morfologia dei globuli rossi, le anomalie strutturali della membrana cellulare e le alterazioni delle capacità metaboliche e ossido-riduttive eritrocitarie confrontando emazie normali e con difetto congenito.
- È stato concluso lo studio dei pazienti STEMI, NON STEMI e angine stabili per valutare le alterazioni emoreologiche nel setting dell'infarto acuto. Sono stati valutati i parametri emoreologici viscosità plasmatica, viscosità ematica nativa e normalizzata, viscoelasticità e aggregazione di tre gruppi di pazienti mettendoli in relazione ai parametri cardiologici, chimico clinici, coagulativi, ecocardiografici, per verificare l'esistenza di una associazione tra alterazioni emoreologiche e incidenza di no-reflow.
- Nell'ambito del progetto finalizzato *New therapeutic approaches in the human beta-thalassemia treatment: in vitro and in vivo studies* U04- Studi clinici nella  $\beta$ -Talassemia: nuove strategie" è continuato lo studio per valutare il profilo emoreologico di pazienti con  $\beta$ -talassemia intermedia e major in relazione ai parametri di disfunzione endoteliale in presenza o meno di terapia ferro-chelante ed è iniziato uno studio per un nuovo approccio diagnostico alla  $\beta$ -talassemia mediante analisi termogravimetrica e chemiometrica.

### *Attività di controllo e valutazione*

- Il Reparto, in qualità di Laboratorio Ufficiale per il Controllo dei medicinali (*Official Medicines Control Laboratory*, OMCL) emoderivati, secondo la norma ISO/IEC 17025, effettua il Controllo di Stato dei medicinali albumina, fattori della coagulazione, inibitori plasmatici e plasma inattivato prima dell'immissione in commercio secondo quanto previsto dal Decreto 31 marzo 2008, con il rilascio di un certificato per ciascun lotto di medicinale valido in tutti i Paesi membri dell'UE nell'ambito del Network Europeo dell'EDQM.
- Nell'ultimo anno ha partecipato allo Studio Collaborativo europeo organizzato dall'EDQM BPS125 Study protocol: Human coagulation Factor VIII concentrate BRP5 riguardante l'assegnazione dei valori allo Standard di Riferimento Internazionale di Fattore VIII.
- È stata effettuata la sorveglianza *post-marketing* e farmacovigilanza dei medicinali emoderivati e la valutazione tecnico-scientifica di dossier dei farmaci emoderivati su richiesta dell'AIFA.
- Nel Reparto si effettuano indagini specialistiche per la diagnosi delle seguenti anemie ereditarie: anemie da difetto enzimatico (deficit di glucosio-6-fosfato deidrogenasi, piruvato chinasi ed esochinasi); anemie da difetto di membrana eritrocitaria (sferocitosi ed ellissocitosi ereditarie).

*Altre attività*

- È stato effettuato il Controllo di Stato di 306 lotti di emoderivati prima della commercializzazione, la sorveglianza post-marketing e la farmacovigilanza di emoderivati, e la consulenza per l'SSN per la diagnosi di anemie ereditarie da difetto enzimatico e di membrana eritrocitaria.
- Sono stati valutate unità di emazie con trait sferocitico per studiare l'invecchiamento di eritrociti durante la conservazione *in vitro* a scopo trasfusionale.
- È stato studiato il profilo emoreologico di pazienti con b-talassemia intermedia e major in relazione ai parametri di disfunzione endoteliale ed è iniziato uno studio per un nuovo approccio diagnostico mediante analisi termogravimetrica e chemiometrica.

**Reparto Biotecnologie oncologiche ed ematologiche**

Il Reparto di Biotecnologie Ematologiche e Oncologiche svolge un'attività prevalente nel campo della ricerca traslazionale volta all'identificazione di nuove terapie mirate antitumorali e dei meccanismi che presiedono alla progressione, chemioresistenza e metastatizzazione dei tumori solidi.

L'attività del Reparto si è concentrata sullo studio delle cellule staminali di tumore del polmone, della mammella e del colon-retto attraverso analisi di espressione genica e proteica, screening di sostanze con potenziale attività farmacologica e indagine dei meccanismi molecolari alla base della capacità metastatica e tumorigenica. In parallelo, sono stati condotti studi di espressione dei microRNA e degli esosomi tumorali nei tumori della prostata.

**Reparto Cellule staminali ed endotelio**

Il Reparto si è occupato di studiare: i) il ruolo di miR204&211 e di RUNX2 nel differenziamento di cellule stromali mesenchimali; ii) il ruolo di un nuovo set di microRNAs delle cellule ematopoietiche che risultano deregolati nelle leucemie; iii) metodiche innovative per l'isolamento e la coltura *in vitro* di progenitori emoangioblastici umani.

Parte del Reparto si è occupato della caratterizzazione biologico-molecolare di cellule stromali mesenchimali e, in modo particolare, della messa a punto di tecniche innovative di proteomica per l'identificazione di nuovi biomarcatori in pazienti con neoplasie (in particolare il melanoma) o con disturbi neurologici e del comportamento (autismo).

**Reparto Emoglobinopatie ed ematopoesi**

Nell'ambito del progetto di ricerca finalizzata MRI è stata fatta luce sui meccanismi molecolari indotti dallo *stem cell factor* (SCF) nella riattivazione della sintesi delle catene  $\gamma$ -globiniche; in particolare, si è potuto dimostrare che il miR 486-3p regola i livelli di espressione del gene BCL11A e, indirettamente, i livelli di sintesi di emoglobina fetale (HbF). È stato quindi valutato l'effetto dello SCF sui fattori trascrizionali BCL11A, SOX6 e KLF1 che agiscono da repressori della sintesi di HbF; i risultati ottenuti hanno mostrato in maniera inequivocabile che lo SCF induce in maniera riproducibile una chiara diminuzione dell'espressione di tutti e tre questi geni repressori. Sono proseguite le attività di sperimentazione pre-clinica *in vitro* e *in vivo* volte a sviluppare nuovi protocolli clinici per il trattamento della  $\beta$ -talassemia: in particolare, il piano progettuale è stato implementato con ulteriori studi *in vitro* sui progenitori ematopoietici purificati e, *in vivo*, sui topi transgenici portatori di catene beta dell'emoglobina umana falciforme trattati o meno con SCF. I risultati

ottenuti mediante analisi HPLC sul sangue di topi falcemici inoculati ripetutamente con SCF per 3-4 settimane mostrano una induzione della sintesi della  $\gamma$ -globina fino al 25%. Tali dati sono stati confermati anche *in vitro* sulle colture di progenitori ematopoietici purificati dal midollo degli stessi topolini. È molto importante sottolineare che durante il trattamento non sono emersi effetti collaterali di alcun tipo.

I dati ottenuti dallo studio dell'espressione della ferroportina e del GDF15 e, in particolare, la loro up-regolazione nei soggetti  $\beta$ -talassemici, indicano chiaramente un loro coinvolgimento nel sovraccarico di ferro tipico di questi pazienti ed hanno portato ad una maggiore comprensione del ruolo della via epcidina-ferroportina nella regolazione stessa del metabolismo del ferro. Molto importante è, a tale proposito, la dimostrazione che lo SCF, ristabilendo un quadro di eritropoiesi efficace, induce una down-regolazione della Ferroportina e del GDF15, riattivando così la sintesi di epcidina che, a sua volta, mediante il legame alla Ferroportina blocca l'anomalo assorbimento di ferro tipico di questa malattia aprendo così la strada a nuovi possibili approcci terapeutici. In parallelo, abbiamo voluto verificare l'esistenza di mutazioni regolative nella regione non tradotta al 5' e/o nel promotore della Ferroportina che potrebbero avere un impatto significativo sulla penetranza fenotipica delle diverse patologie caratterizzate da sovraccarico di ferro primario o secondario, quali ad esempio la beta-talassemia o la emocromatosi ereditaria di tipo 4, rispettivamente. Molte delle variazioni di sequenza osservate sono localizzate in prossimità di siti di binding per fattori di trascrizione o di sequenze riconosciute da proteine sensibili al livello di eme intracellulare, rafforzando così l'ipotesi di una possibile influenza sul livello di trascrizione della var IRE e no-IRE della ferroportina. L'ipotesi che le variazioni a singolo nucleotide nel gene della ferroportina possano avere un ruolo nella regolazione del metabolismo del ferro apre la strada al loro uso come biomarcatori nella medicina individualizzata.

Nell'ambito dello studio dei meccanismi alla base della "resistenza all'aspirina" in pazienti con disturbi cardiovascolari, svolto in collaborazione con l'Università Sapienza di Roma, negli anni precedenti è stato evidenziato che l'aspirina può essere espulsa dalle piastrine attraverso il trasporto mediato dalla proteina MRP4 (*multidrug resistance protein-4*) e la over-espressione di questo trasportatore è alla base del fallimento dell'azione antiplastrinica dell'aspirina. La ricerca è quindi proseguita analizzando, sia *in vivo* che *in vitro*, gli effetti che l'aspirina induce sull'espressione genica nei megacariociti. I nostri studi suggeriscono che le cellule megacariocitarie umane hanno una risposta adattativa al trattamento con aspirina che porta ad un aumento dell'espressione di MRP4 nelle piastrine. Questo risultato rappresenta un approccio innovativo e interessante con implicazioni cliniche sia per l'identificazione di pazienti meno sensibili al trattamento con aspirina sia per migliorare il trattamento stesso nei pazienti ad alto rischio cardiovascolare.

I microRNA giocano ruoli chiave in diverse patologie umane e in particolare nelle AML sono riconosciuti come potenziali marker diagnostici e target terapeutici. Nell'ambito del programma Oncotecnologico, è stata analizzata l'espressione del miR-21 e del suo target PDCD4 nel differenziamento granulo-monocitico normale e nelle AML. Come nei tumori solidi, abbiamo evidenziato che anche nei blasti leucemici il miR-21 è fortemente deregolato e che la sua espressione è particolarmente elevata nelle NPM1mut/AML, portando quindi all'identificazione di un sottogruppo di AML con un ben definito immunofenotipo.

Nell'ambito dei progetti riguardanti la caratterizzazione delle *cancer stem cells* (CSC) di colon, i risultati ottenuti dagli studi finora effettuati hanno permesso la validazione delle CSC come modelli predittivi di risposta alla terapia nei pazienti; in particolare, lo studio compiuto durante lo scorso anno ha portato alla caratterizzazione di fattori di modulazione della sensibilità ad anticorpi inibitori di EGFR su alcune linee-pilota. L'analisi di un pannello di linee più esteso è tuttora in corso.

#### *Attività istituzionale*

Espletamento di pratiche di comma C e di mutuo riconoscimento concernenti controlli e pareri di competenza sull'immissione in commercio di specialità medicinali e fattori di crescita ricombinanti nonché autorizzazioni alla sperimentazione animale ai sensi degli art. 8-9 del DL.vo 116.

### **Reparto Fisiopatologia delle malattie genetiche**

L'attività di ricerca del Reparto si inquadra nell'ambito dell'oncogenomica e della genetica molecolare, umana e medica. Diverse linee di ricerca sono dirette alla comprensione delle basi molecolari delle RASopatie, un gruppo di malattie dello sviluppo con predisposizione all'insorgenza di neoplasie, e di altre malattie genetiche rare, attraverso l'uso di nuove tecnologie di sequenziamento ad alta processività del genoma e del trascrittoma. Il ruolo patogenetico delle lesioni molecolari sottostanti queste malattie viene caratterizzato utilizzando modelli animali (*C. elegans*) e sistemi sperimentali *in vitro*. Nell'ambito dell'oncogenomica, l'attività è rivolta all'identificazione di nuovi eventi molecolari implicati nell'oncogenesi. Infine, l'attività di ricerca è volta alla comprensione dei meccanismi molecolari e cellulari alla base della sindrome di Gaucher.

L'attività svolta nel 2014 è stata finalizzata all'identificazione di nuovi geni-malattia implicati nelle RASopatie e in altre malattie dello sviluppo e alla comprensione dei sottostanti meccanismi patogenetici. Tra i diversi risultati ottenuti, l'attività sperimentale ha portato all'identificazione di nuovi geni-malattia implicati in una RASopatia con predisposizione all'insorgenza di leucemie in età pediatrica, nella sindrome di Primrose e nella glomerulosclerosi focale e segmentale. Studi di oncogenomica sono stati diretti alla caratterizzazione dei profili mutazionali delle cellule staminali tumorali. Infine, l'attività di ricerca è stata rivolta allo studio delle varianti della saposina C associate a una forma rara di malattia di Gaucher.

### **Reparto Fisiopatologia delle malattie renali e patologie correlate**

Come negli anni precedenti l'attività del Reparto ha riguardato principalmente l'oncologia sperimentale e la malattia renale cronica.

Nel corso del 2014 abbiamo ampliato la collezione di linee di cellule staminali tumorali isolate da campioni di pazienti affetti da glioblastoma (GBM). Queste linee (GSC) sono state amplificate e validate per le loro proprietà di cellule staminali tumorali. Abbiamo confermato in una più ampia serie di GBM (139) osservazioni precedenti, ovvero che la generazione di GSC è un significativo predittore negativo di sopravvivenza confermando la nostra convinzione dell'importanza di questa sottopopolazione nello sviluppo e nella progressione tumorale (manoscritto in preparazione). Abbiamo analizzato il profilo di espressione genica di una parte delle linee e abbiamo verificato che il clustering dei campioni effettuato considerando i 1000 geni/trascritti più variabili suddivideva le linee in due gruppi distinti come precedentemente descritto in letteratura. La distribuzione dei nostri campioni è conforme con questa classificazione in due gruppi in particolare il gruppo definito "GSf" (*full stem-like phenotype*) è più simile ai campioni di GBM mentre l'altro "GSr" (*restricted stem-like phenotype*) presenta maggiore affinità con la componente staminale del tumore. In collaborazione con la dr.ssa Antonella Rosi (TESA) abbiamo analizzato il profilo metabolico delle linee GSC mediante 1H-NMR confermando l'esistenza di due sottotipi principali basata sulla presenza/assenza di marcatori spettroscopici. Inoltre, la presenza di un diverso segnale di attivazione di diverse vie



di trasduzione del segnale è stata confermata dalla *Reverse Phase Protein Microarray* (RPPM) nelle due popolazioni GCSs (manoscritto in preparazione). Sempre nel glioblastoma abbiamo anche completato l'analisi funzionale del miR-135b precedentemente caratterizzato come uno dei miRNAs più significativamente down-regolato nelle linee GSC rispetto a linee di staminali neurali normali. La riespressione del miR-135b in 7 linee di GSC, a livelli paragonabili a quelli delle cellule normali, produce una significativa riduzione della proliferazione cellulare, della migrazione e della capacità di formare colonie suggerendo un potenziale ruolo di soppressore tumorale per questo miRNA nel contesto del GBM. Gli esperimenti *in vitro* sono stati confermati *in vivo* in modelli ortotopici (manoscritto in preparazione).

Nella sezione di proteomica in fase inversa (*Reverse Phase Proteomic Array*, RPPA) è proseguita la caratterizzazione dei profili di attivazione di segnali intracellulari in particolare in cellule staminali tumorali di carcinomi del colon-retto e di glioblastomasia in condizioni basali di coltura sia dopo trattamento con farmaci antineoplastici con lo scopo di individuare vie di segnale utilizzabili per disegnare nuovi approcci terapeutici basati su agenti a bersaglio molecolare specifici, i risultati sono oggetto di alcune pubblicazioni in corso di sottomissione. Sono state inoltre svolte attività di collaborazione con gruppi di ricerca esterni ad ISS come l'Istituto Nazionale Tumori di Milano per la valutazione di proteine presenti nel liquido cefalorachidiano.

Lo studio del ruolo dei microRNA nello sviluppo del carcinoma del colon-retto è stato approfondito nel corso del 2014. Lo screening di inibitori (LNA) effettuato su cellule mutanti nel *pathway* di KRAS ha portato alla selezione di 10 LNA in grado di inibire significativamente la vitalità e/o la proliferazione cellulari. L'effetto di tali LNA è stato analizzato in un pannello di linee commerciali di carcinoma del colon-retto e di cellule staminali tumorali isolate da pazienti, anch'esse con mutazioni che attivano costitutivamente il *pathway* di KRAS. La nostra attenzione si è focalizzata su 2 microRNA, il cui ruolo oncogenico è stato caratterizzato con saggi di biologia cellulare *in vitro*, nonché da un punto di vista molecolare, effettuando analisi del trascrittoma al fine di identificare i bersagli di detti microRNA e i *pathway* che vengono da essi regolati. Nell'immediato futuro sarà nostra cura terminare le analisi molecolari e proseguire con la validazione *in vivo* del potenziale terapeutico del nostro approccio. In un esperimento preliminare abbiamo messo a punto un modello di metastasi epatica mediante l'iniezione di cellule staminali tumorali nella milza di topi immunodeficienti. Procederemo con il trattamento sistemico con LNA specificamente modificati per raggiungere elevata stabilità *in vivo*, somministrandoli da soli o accoppiati a sostanze di derivazione liposomiale che possano facilitarne il delivery.

La produzione di anticorpi monoclonali verso cellule staminali di carcinomi del colon-retto (CSC-CR) è proseguita, in un progetto europeo nell'ambito del sesto programma EuroTranBio insieme a due piccole aziende biotecnologiche in Italia e Germania, utilizzando un approccio diverso da quello "classico" descritto in precedenza. Schematicamente il lavoro è consistito nella individuazione dei potenziali bersagli mediante analisi dei geni preferenzialmente espressi dalle CSC-CR rispetto a tessuti sani o cellule di linee cellulari commerciali e nell'utilizzo dei cDNA corrispondenti per immunizzare dei ratti dai quali sono stati ottenuti gli splenociti per la preparazione degli ibridomi. Al termine dello screening condotto mediante citofluorimetria sono stati selezionati anticorpi verso 5 antigeni ed è iniziata la caratterizzazione funzionale di alcuni di essi

Per quanto riguarda lo studio delle malattie renali, nel corso dell'anno 2014 è proseguita l'attività di validazione e analisi dei risultati relativi allo studio clinico longitudinale, multicentrico, mirato a valutare gli effetti a breve e lungo termine dell'utilizzo di membrane dialitiche a diversa porosità nell'ambito di trattamenti di emodiafiltrazione con re-infusione dell'ultrafiltrato (HFR) in pazienti con malattia renale cronica in stadio terminale. Lo studio ha dimostrato che l'utilizzo di membrane a più alto cut-off molecolare si associa ad una migliore depurazione e un più favorevole quadro vitaminico e che la tecnica di re-infusione dell'ultrafiltrato

rispetto alla emodiafiltrazione standard consente di limitare significativamente la perdita intradialitica di vitamina C e di riequilibrare lo stato redox plasmatico. È stato inoltre completato lo studio relativo alla stabilità della vitamina C in campioni di sangue e plasma umani: lo studio ha prodotto la messa a punto di una procedura semplice e affidabile in grado di aumentare significativamente la stabilità dell'analita riducendo al minimo le manipolazioni del campione. Il metodo risulta di particolare utilità nell'ambito di studi clinici ed epidemiologici e ogniqualvolta sia necessaria la conservazione a medio-termine del campione prima dell'analisi.

Nel corso dello stesso anno è stata inoltre avviata una collaborazione con CNR e Università Sapienza di Roma al fine di sviluppare un dispositivo originale in grado di alloggiare colture cellulari e contemporaneamente rilevarne diverse proprietà biofisiche sfruttando tecniche avanzate di acustica di superficie. Detto dispositivo è previsto per condurre indagini di biologia cellulare, farmacologia e tossicologia.

Al personale del Reparto è affidato il compito della gestione della facility di citofluorimetria e citometria di massa del dipartimento nella quale si effettuano analisi e sorting mediante citometria a flusso multiparametrica oltre che nell'ambito dei progetti del Reparto anche a supporto degli altri reparti del dipartimento o in collaborazione con altri dipartimenti dell'Istituto o con gruppi di ricerca di altre istituzioni.

In ambito istituzionale, nel corso del 2014 è proseguita la collaborazione con il Servizio di Prevenzione e Protezione, in particolare con la partecipazione a sopralluoghi per l'aggiornamento del DVR, a valutazioni di problematiche relative alla sicurezza dei luoghi di lavoro e alla tutela della salute dei lavoratori e ad attività di informazione e formazione specifica del personale dell'ISS, ai sensi dell'art.37 del DL.vo 81/2008 e accordo Stato-Regioni del 21/12/2011.

Altra attività istituzionale svolta dal Reparto è rappresentata dall'impegno nella valutazione dei protocolli di studio clinico e nella estensione di 28 pareri per la Commissione per la valutazione della sperimentazione clinica di fase I, su quesiti rivolti all'Istituto da altre amministrazioni e in 3 procedure di autorizzazione al commercio di nuovi farmaci con procedura centralizzata europea.

## **Reparto Immunoregolazione**

Il Reparto ha svolto le seguenti attività:

### *Interazioni precoci HIV-1/cellule dell'immunità innata nella patogenesi dell'AIDS*

Sono stati completati gli studi riguardanti:

- la caratterizzazione delle vie di trasduzione del segnale attivate dall'interazione precoce di HIV-1 gp120 con cellule dendritiche (DC), con macrofagi e con cellule stellate epatiche;
- le alterazioni del cross-talk tra DC e linfociti T  $\gamma\delta$  nell'infezione da HIV-1;
- la definizione del ruolo della CCL2 e dei meccanismi molecolari che regolano l'espressione di fattori di restrizione cellulari (APOBEC3 e SAMHD1) nell'infezione da HIV-1 dei monociti/macrofagi.

Sono stati inoltre condotti studi riguardanti:

- il ruolo di microRNA (miR) nei meccanismi molecolari coinvolti nell'interazione precoce HIV/DC;
- approcci farmacologici per il blocco dell'asse CCL2/CCR2 nel controllo della replicazione di HIV-1.

### *Approcci molecolari per il potenziamento dell'attività delle DC nell'immunoterapia dei tumori*

È stato completato lo studio riguardante le conseguenze funzionali del silenziamento di STAT3 nelle risposte mediate da linfociti T  $\alpha\beta$  e  $\gamma\delta$ . È in corso di completamento lo studio sugli effetti di inibitori di STAT3 sul signaling JAK/STAT in DC.

*Attività immunomodulatoria della Vitamina D3 e della lattoferrina bovina in DC*

I risultati del lavoro riguardante l'analisi e comparazione della risposta alla 1,25(OH)2D3 di DC generate da pazienti con sclerosi multipla (SM) sono stati in parte pubblicati e in parte sono in corso di assemblaggio per la pubblicazione. È stata inoltre conclusa l'analisi dello status della vitD3 nei pazienti affetti da SM. È stato inoltre completato lo studio riguardante il meccanismo e i recettori coinvolti nell'induzione di CCLI da parte della lattoferrina bovina (bLF).

*Tessuto adiposo e dieta nella regolazione dell'infiammazione e della risposta immune.*

In collaborazione con il Dipartimento SPVSA è stato completato lo studio sulla capacità di composti polifenolici di prevenire/attenuare alterazioni immunologiche e infiammazione inappropriata in DC.

Sono stati condotti studi atti a definire:

- la "signature" infiammatoria del tessuto adiposo in relazione alla composizione in acidi grassi e presenza di patologie (tumore del colon e obesità);
- le alterazioni sistemiche nell'omeostasi delle cellule T nelle patologie sopra indicate;
- l'influenza del microambiente del tessuto adiposo sul differenziamento/attivazione di DC e sulla fisiologia dell'epitelio intestinale.

*Modelli cellulari avanzati per la definizione delle proprietà biologiche dei tumori*

In collaborazione con il CNR di Sassari e il Policlinico A. Gemelli di Roma sono continuati gli studi con sferoidi 3D di melanoma mirati a determinare se distinti pattern mutazionali dei melanomi correlano con il loro grado di radiosensibilità e immunogenicità, e con specifiche "signature" metabolomiche.

*Recettori degli estrogeni, omeostasi intestinale e sviluppo di malattie infiammatorie croniche*

In collaborazione con il Dipartimento BCN sono stati condotti studi atti a definire l'utilizzo del recettore  $\beta$  per gli estrogeni come possibile biomarcatore dell'attività di malattia e risposta alla terapia nelle malattie infiammatorie intestinali (IBD).

*Attività di formazione e valutazione*

Il Reparto contribuisce alla formazione di studenti delle scuole di dottorato in "Scienze Immunologiche" e "Malattie Infettive, Microbiologia e Sanità Pubblica", e di studenti dei corsi di laurea specialistica in Biotecnologie e in Scienze Biologiche.

Inoltre, il Reparto svolge attività di valutazione di articoli scientifici per diverse riviste internazionali ed ha partecipato all'organizzazione del corso residenziale "Le pandemie del III millennio".

## **Reparto Immunoterapia sperimentale**

Il Reparto ha svolto le seguenti attività:

*Sperimentazione su modelli umani e murini relativa a progetti nell'area dell'immunologia e immunoterapia dei tumori finanziati dall'AIRC ("Control of direct and immune-mediated antitumor activities of IRF-8 by epigenetic drugs in colorectal cancer"; "Understanding and exploiting type I IFN antitumor immune mechanisms for development of novel cancer therapies"; "Dissecting IL-33/ST2-dependent pathways in antitumor immune response to melanoma") e dal Ministero della Salute (RF, "Cell-on-chip technology as a novel tool to investigate the crosstalk between cancer and immune cells: role of the transcription factors Interferon Regulatory Factor 1 and 8 (IRF1, IRF8) in melanoma as a model system".*

In particolare, sono stati svolti i seguenti studi:

- valutazione dell'attività antitumorale della combinazione di farmaci epigenetici (inibitori di HDAC e azacitidina) e dell'IFN-I su linee cellulari e staminali di CRC e in modelli *in*

- vitro* e *in vivo* di melanoma murino e umano, in termini di arresto di proliferazione cellulare, modulazione dell'apoptosi e segnali associati, blocco del ciclo cellulare;
- valutazione del ruolo di CXCR4 in cellule tumorali umane nella correlazione tra potenziale metastatico e infezioni virali;
  - studio del ruolo di IRF-8 nel crosstalk tra cellule immuni e melanoma, con particolare attenzione al processo autofagico, in modelli murini IRF-8 KO trapiantati con linee di melanoma B16.F10 anche mediante uso di dispositivi microfluidici basati su nanotecnologie e su modelli matematici;
  - studio del ruolo del pH extracellulare in cellule tumorali umane e del ruolo di IFN-I/microRNA nel differenziamento di DC;
  - studio del ruolo dell'IFN-I nella funzione di DC in pazienti con TB latente e attiva;
  - studio dell'over-espressione di IRF-8 e IRF-1 in DC umane;
  - studio degli effetti dell'infezione da HIV-1 (X4 e/o R5 strains) in cellule di CRC;
  - studi dell'attività antitumorale di IL-33 in modelli di melanoma primario e metastatico murino B16.F10;
  - messa a punto di protocolli di trasfezione di cellule di melanoma B16.F10 e A375 con vettori retrovirali e lentivirali overesprimenti i fattori di trascrizione IRF1 e IRF8;
  - studi preliminari sul ruolo degli esosomi nel processo metastatico del melanoma;
  - studi sugli effetti di mutazioni geniche rilevanti nella risposta clinica alle antracicline in pazienti con carcinoma mammario nel cross-talk tra tumore e cellule immuni mediante dispositivi microfluidici;
  - attività di coordinamento per la piattaforma dei Vaccini dell'infrastruttura europea EATRIS e per la rete italiana IATRIS. In tale contesto, il Reparto ha inoltre partecipato a progetti europei, quali il progetto FP7 "European Research Infrastructures for Poverty Related Diseases" (EURIPRED).

*Attività di ricerca e sviluppo traslazionale*

- Studi per lo sviluppo di un vaccino terapeutico per linfomi non-Hodgkin (NLH) indolenti a cellule B (Collaborazione AO Sant'Andrea, Roma) mediante l'acquisizione di linee continue di linfomi mantellari e follicolari e campioni biologici (linfonodi, sangue periferico e midollare) da pazienti con linfomi indolenti. Gli studi in corso hanno confermato che cellule dendritiche ottenute con metodiche particolari (IFN-DC), ottenute da pazienti con linfoma follicolare, pulsate con corpi apoptotici di linfoma autologo, inducono una potente risposta immune CD4 (Th1), CD8 ed espansione di linfociti NKT.
- Sono proseguiti gli studi per la caratterizzazione della risposta immune cellulare umana verso antigeni di Linfoma Mantellare (Collaborazione Centro di Riferimento Oncologico IRCCS, Aviano) mediante immunizzazione di topi SCID con IFN-DC caricate con lisati ottenuti da linee di linfoma mantellare dopo trattamento con RA (9-cis-retinoic acid) +IFN-alpha. I risultati evidenziano l'induzione di alti livelli di risposta cellulare nei saggi *ex vivo* e riduzione di crescita tumorale *in vivo*.

*Attività orientate all'immunoterapia sperimentale clinica mediante l'utilizzo dell'Officina Farmaceutica FaBioCell*

- È terminato il follow-up dei pazienti arruolati nel protocollo clinico *IFN-Dendritic cell-based immunotherapy in association with chemotherapy in advanced cancer patients* (Collaborazione IDI e A. O. Sant'Andrea, Roma).
- È iniziato l'arruolamento dei pazienti nel trial *IFN-DC-based immunotherapy in combination with Rituximab in indolent non-Hodgkin lymphoma patients: a phase I clinical trial (NLH-IFNDC-2)* (collaborazione AO Sant'Andrea, Roma).

- È stata ottenuta l'autorizzazione alla sperimentazione clinica del trial Phase I protocol of adoptive immunotherapy with enriched and expanded autologous natural killer (NK) cells for patients with Ph+ acute lymphoblastic leukemia (ALL) in complete hematologic remission (CHR) but with persistent minimal residual disease (MRD)  $\geq 60$  years or not eligible for other post-CHR treatment modalities" (Collaborazione Università Sapienza di Roma).

## Reparto Lipidi e arteriosclerosi

L'attività del Reparto è fortemente incentrata nello studio di alcune specializzazioni delle membrane cellulari in particolare: 1) la caveola, una porzione distinta della plasma membrana in cui è contenuta l'associazione molecolare che organizza il segnale cellulare (questo sub-compartimento cellulare rappresenta anche un sito elettivo per lo studio della formazione neoplastica e del metabolismo lipidico e un possibile bersaglio farmacologico); 2) gli esosomi, organelli di 50-100 nm secreti da tutti i tipi cellulari attraverso un meccanismo di esocitosi, sia in condizioni fisiologiche che patologiche. Gli esosomi contengono miRNA, mRNA, molecole segnale, fattori di trascrizione ecc. che sono in grado di trasferire con grande efficienza da cellula a cellula conseguendo un effetto fisiologico di omeostasi cellulare. In modo antitetico gli esosomi provenienti da cellule patologiche (tumorali) trasmetteranno molecole in grado di indurre modificazioni epigenetiche. Caveole ed esosomi condividono porzioni di membrana comuni ma formano microdomini funzionalmente distinti secondo un piano cellulare pianificato. Isolati i due domini e analizzati con la proteomica, lipidomica o per gli RNA contenuti (trascritto mica) è possibile ottenere un insieme unico e integrabile di informazioni sugli avvenimenti molecolari che modificano il programma di un tumore primario in un metastatico.

Pur avendo sviluppato molti degli obiettivi delle ricerche che il Reparto si era posto di realizzare sperimentalmente nel 2014 i forti ritardi burocratici nell'erogazione dei fondi hanno precluso il raggiungimento di dati necessari alla produzione di lavori scientifici. I fondi della ricerca finalizzata Biomedical RF-2011-02347300 previsti nel 2014 sono arrivati alla stesura di questa rendicontazione.

## Reparto Metodologie trasfusionali

L'attività del Reparto di Metodologie Trasfusionali si svolge nell'ambito di due aree principali, una di ricerca oncologica/ematologica e una di controllo.

I principali progetti di ricerca sono relativi a:

- Studi *in vitro* e *in vivo* sul ruolo delle cellule stromali mesenchimali (MSC) nell'interazione con cellule staminali tumorali di polmone (LCSC). I risultati hanno evidenziato un effetto proliferativo delle MSC derivate dalla gelatina di Wharton del cordone ombelicale (WJ-MSC) sulle LCSC *in vitro*, attraverso un meccanismo paracrino, che determina anche un aumento delle cellule staminali tumorali. L'effetto proliferativo è evidenziato anche *in vivo* mediante esperimenti di xenotrapianto in NOD/SCID inoculati con LCSC o LCSC/WJ-MSC: i tumori indotti da LCSC/WJ-MSC sono significativamente più grandi di quelli indotti da LCSC.
- Studi *in vitro* sulla capacità delle WJ-MSC di differenziare in senso neuronale. Il differenziamento neurale delle WJ-MSC è stato ottenuto in presenza di forskolina, un fattore noto per aumentare il livello intracellulare di adenosin monofosfato ciclico (cAMP). Le WJ-MSC stimulate con forskolina rilasciano il fattore neurotrofico BDNF

che regola il differenziamento neurale, la sopravvivenza e il riparo di specifici sottotipi di neuroni. Studi *in vitro* e *in vivo* sul ruolo delle MSC nell'interazione con cellule staminali/progenitrici ematopoietiche. I risultati ottenuti dimostrano che le WJ-MSK inducono l'amplificazione delle cellule staminali ematopoietiche derivate da sangue di cordone, in un sistema di co-cultura *in vitro*, e che le cellule espanse hanno maggiore capacità di ripopolare il midollo di topi immunodepressi, rispetto alle cellule CD34+ non espanse, dimostrando l'efficacia delle WJ-MSK non solo di preservare ma anche di migliorare le caratteristiche di ripopolamento delle cellule staminali/progenitrici ematopoietiche durante la coltura.

- Studi sugli effetti delle radiazioni ionizzanti sulle MSC di tessuto sano nell'ambito della problematica degli effetti collaterali della radioterapia in pazienti oncologici. Risultati preliminari su WJ-MSK hanno evidenziato che le radiazioni ionizzanti riducono la percentuale di cellule in fase S, promuovono l'uscita dal ciclo cellulare e inducono la senescenza.
- Produzione di anticorpi monoclonali verso cellule tumorali staminali di adenocarcinoma polmonare. Sono stati purificati due anticorpi monoclonali, 4C5.1 e 13A7.2, in grado di ridurre la vitalità delle LCSC del 30% e 40%, rispettivamente. L'analisi immunostochimica relativa all'anticorpo 13A7.2 ha mostrato una localizzazione citoplasmatica sulle sezioni di adenocarcinoma polmonare, una localizzazione nucleare sul carcinoma polmonare a cellule squamose e una costante negatività sul tessuto polmonare sano.

#### *Attività di controllo*

Si articola su tre aree principali:

- Valutazione di sicurezza e qualità dei dossier dei farmaci emoderivati.

Il Reparto svolge un'importante attività di valutazione relativa alla qualità dei dossier di farmaci emoderivati, nell'ambito della convenzione ISS/AIFA. La tipologia di pratiche esaminate è la seguente:

  - Procedure europee (mutuo riconoscimento, decentrate e centralizzate)
  - Procedure nazionali, distinte in Nuove AIC, Variazioni all'AIC, rinnovo di AIC.
  - Periodicamente vengono richieste anche a) valutazioni tecnico-scientifiche *ad hoc* di procedure europee (VHP) di dossier di farmaci da utilizzare nella sperimentazione clinica
  - Consulenze scientifiche relative a procedure europee di Scientific Advice
  - valutazioni della documentazione a supporto di domande di richiesta di importazione/esportazione del sangue umano e dei suoi prodotti (DM 12 aprile 2012)
  - partecipazioni a tavoli istituzionali (Ministero della Salute, AIFA) in cui sono trattati temi relativi alla qualità/sicurezza degli emoderivati e dei farmaci di interesse ematologico.
- Redazione di pareri su farmaci di nuova istituzione. Con i suoi esperti designati il Reparto si occupa di valutare, nell'ambito della sperimentazione clinica di fase I, qualità e protocollo clinico dei dossier di farmaci emoderivati e ricombinanti di nuova istituzione destinati ai pazienti con coagulopatie congenite, alterazioni della componente piastrinica del sangue e con altre patologie del sistema ematopoietico.
- Registro Nazionale delle Coagulopatie Congenite (RNCC). Il Reparto cura il mantenimento del RNCC che è attivo dal 2006 ed è inserito nel Piano Statistico Nazionale. Oltre alle informazioni sulla prevalenza e sulle complicanze di queste patologie, il monitoraggio dei dati sul trattamento farmacologico dell'emofilia in Italia consente di ottenere informazioni molto utili sui bisogni terapeutici attuali e futuri della

popolazione emofilica, anche in previsione dei cambiamenti correlati ai nuovi farmaci e all'invecchiamento della popolazione.

### **Reparto Oncologia medica**

L'attività di ricerca svolta è stata indirizzata lungo quattro filoni principali: analisi del ruolo svolto da alcuni micro-RNA nel controllo dell'ematopoiesi normale e leucemica; studio delle "cancer stem cells" nel carcinoma dell'ovaio; la deregolazione del fattore trascrizionale HHEX nelle leucemie acute e nei tumori solidi; ruolo dell'ipossia nel controllo dell'espressione e della funzione di micro-RNA nelle cellule tumorali (leucemie e tumori solidi).

### **Reparto Oncologia molecolare**

I principali progetti di ricerca si sono focalizzati su:

- Studi di espressione e funzione di microRNA, *in vitro* e *in vivo*, nel melanoma: ruolo chiave della proteina TFAP2 $\alpha$  nel circuito miR-126&126\* $\leftrightarrow$ miR-221&222. Valutazione delle potenzialità terapeutiche: abrogazione degli oncomiR-221&222 ed espressione ectopica dei microRNA soppressivi miR-126&126\*.
- Ruolo antimetastatico dell'enzima desaturasi SCD5 e del suo prodotto, acido oleico, nel melanoma. La riespressione di SCD5, *in vitro* e *in vivo*, influenza il microambiente tumorale modificando il pH e inibendo la secrezione di fattori pro tumorali.
- Ruolo tumorigenico degli esosomi rilasciati da cellule di melanoma: valutazione dell'espressione di microRNA, delle vie di trasduzione e delle capacità trasformanti.
- Ruolo funzionale degli esosomi nel sarcoma di Ewing; trasferibilità del miR-34 e della proteina CD99;
- Dinamica molecolare dei complessi proteici HLH/CREB.

## DIPARTIMENTO DEL FARMACO

La missione del Dipartimento del Farmaco (FARM) è centrata sulla valutazione di qualità, sicurezza, efficacia e appropriatezza d'uso di medicinali e terapie e sulla ricerca di nuovi farmaci e nuove terapie per le malattie che colpiscono l'uomo, al fine di contribuire concretamente a difendere la salute delle persone che vivono nel nostro Paese e a promuovere l'accesso universale alle cure e alle terapie disponibili a livello globale. Oltre a promuovere la ricerca nei settori più innovativi della farmacologia sperimentale, il FARM realizza e coordina iniziative orientate a potenziare la ricerca farmacologica e clinica di tipo pubblico nel nostro Paese, per favorirne l'integrazione, in funzione del comune obiettivo di curare e prevenire le malattie dell'uomo. Prioritario è chiaramente lo sviluppo delle collaborazioni con i centri di ricerca nazionali e internazionali più attivi e qualificati.

Le attività di consulenza tecnico-scientifica sono generalmente svolte su mandato del Ministero della Salute, dell'AIFA e di altre istituzioni nazionali. Con i suoi esperti, il FARM esegue la valutazione dei dossier registrativi per quanto attiene a qualità, sicurezza d'uso e efficacia dei medicinali in relazione alle procedure centralizzate europee e al mutuo riconoscimento. Il Dipartimento svolge anche una consistente attività di consulenza altamente qualificata per l'EMA (Londra). Per quanto riguarda le attività di controllo strumentali, il FARM, in collaborazione con Istituzioni pubbliche nazionali e internazionali, sviluppa programmi per la valutazione delle caratteristiche chimiche e della purezza dei medicinali (incluse le specialità, i prodotti generici, i medicinali magistrali e officinali e quelli derivati dalle piante medicinali), dei prodotti di erboristeria, dei presidi medico-chirurgici e dei prodotti cosmetici, anche come Laboratorio Ufficiale di Controllo per la qualità dei Medicinali (OMCL-EDQM). La farmacovigilanza sui medicinali dopo la loro immissione in commercio comprende gli accertamenti sperimentali per la verifica della qualità dei medicinali, con un grande progetto sulla contraffazione dei medicinali (IMPACT), e quelli conseguenti a segnalazioni di difetti e di reazioni avverse e quelli ispettivi sull'osservanza delle norme di Buona Pratica di Laboratorio (BPL o *Good Laboratory Practice*, GLP) e di fabbricazione (*Good Manufacturing Practice*, GMP). Il FARM svolge anche attività di consulenza su richiesta dall'Autorità Giudiziaria. Tutte le attività di controllo del Dipartimento sono svolte sotto Sistema di Assicurazione di Qualità. Altre attività istituzionali del FARM includono i) il coordinamento del Segretariato della Farmacopea Ufficiale Italiana che, in quanto Ente deputato alla definizione degli standard di qualità dei prodotti medicinali e delle sostanze usate nella loro fabbricazione, è anche punto di riferimento nazionale per il Segretariato della Farmacopea Europea; ii) l'Osservatorio su Fumo, Alcol e Droga: il Dipartimento si propone l'attività di rilevazione e informazione dei cittadini sui danni relativi all'uso e all'abuso di tali sostanze e educarli sul buon uso del farmaco e delle terapie disponibili; iii) la Segreteria della Commissione per l'autorizzazione delle sperimentazioni di fase I, per le quali l'ISS è autorità competente nazionale. Infine, il FARM è impegnato in un'intensa attività di formazione, in particolare su farmaci e terapie, e partecipa alla messa a punto di linee-guida e protocolli terapeutici oltre che svolgere studi su qualità della vita e farmaco-economia. Con l'attività dei propri esperti partecipa ai lavori di organismi nazionali e internazionali, compresi quelli relativi ai piani d'intervento e alle iniziative socio-sanitarie per facilitare l'accesso a farmaci e alle terapie nei Paesi del Sud del mondo (WHO; *Joint United Nations Programme on HIV/AIDS*, UNAIDS; *Global Fund*). Per quanto riguarda i progetti di ricerca, sia clinica che di base, il FARM sviluppa, in accordo con gli organi istituzionali dell'ISS, con il Ministero della Salute, con l'AIFA e con le Autorità Sanitarie Regionali, attività di ricerca clinica su terapie innovative