stimolo proliferativo utilizzando la via di trasduzione intracellulare calcio-dipendente, ma bypassando il TCR; infine, l'anticorpo monoclonale anti-CD3 immobilizzato (10 μg/ml) da solo o con l'anticorpo monoclonale anti-CD28 solubile (1 μg/ml), che agiscono direttamente sul TCR e sui recettori delle molecole costimolatorie, attivando così il linfocita T in modo aspecifico e indipendente dalla capacità di riconoscimento dell'Ag. La risposta proliferativa in seguito ad uno stimolo antigenico presuppone, invece, un'appropriata presentazione dell'Ag da parte delle APC del soggetto in esame e la corretta funzionalità del TCR dei linfociti T, in termini sia di riconoscimento del complesso MHC-Ag sia di capacità di trasduzione intracellulare del segnale stimolatorio. Tale competenza è stata valutata analizzando la proliferazione cellulare in risposta ad Ag verso i quali i soggetti sono abitualmente sensibilizzati, come il tossoide tetanico (TT 50 μM), se è stata effettuata la relativa vaccinazione, e la Candida Albicans (rapporto 5:1 tra numero di spore e cellule), e verso Ag che devono essere riconosciuti come non-self anche se non precedentemente incontrati, come gli Ag HLA allogenici.

Questi ultimi sono costituiti da una miscela di PBMC CD3-deplete di diverso HLA, irradiate a 6.000 rad, e piastrate in rapporto 1: 1 con le PBMC del campione in esame.

Le cellule vengono piastrate a una concentrazione di 5 x 10^5/ml, per osservare la risposta agli stimoli policlonali e agli alloAg, e a una concentrazione di 10^6/ml, per la risposta Ag-specifica: in quest'ultimo caso, si aumenta la concentrazione delle PBMC piastrate per aumentare la possibilità che i monociti contenuti nella sospensione cellulare possano servire da APC. Le colture sono allestite in triplicato in piastre a 96 pozzetti a fondo tondo. Dopo un periodo di incubazione a 37°C in atmosfera al 5% di CO_2 (3 o 4 giorni, a seconda dello stimolo utilizzato) viene aggiunto 1 μCi di timidina triziata in ogni pozzetto. Dopo 16-18 ore le colture sono raccolte con un raccoglitore automatico, che legge la radioattività presente in ogni pozzetto. I risultati sono espressi in colpi per minuto (cpm) di timidina triziata incorporata in ogni singola coltura, misura direttamente correlata alla proliferazione cellulare avvenuta.

Produzione di citochine in seguito a stimolazione policlonale - le PBMC vengono stimolate a proliferare in presenza di diverse sostanze ad azione mitogena. Durante l'incubazione, le cellule rilasciano nel mezzo di coltura le citochine, che vengono analizzate in questi esperimenti. Le cellule, piastrate ad una concentrazione di 10^6/ml, vengono stimolate nelle diverse condizioni con PHA (1 μg/ml), anti-CD3 immobilizzato (10 μg/ml) con anti-CD28 solubile (1 μg/ml), TPA (10 ng/ml) con ionomicina (150 ng/ml). In parallelo viene valutata la produzione di citochine basale, che è solitamente negativa, mettendo le cellule in assenza di stimolazione. L'incubazione avviene a 37°C in CO_2 al 5%. Vengono quindi prelevati i surnatanti, dopo 24 ore, per la quantificazione dell'IL-2, e dopo 72 ore, per le altre citochine. I campioni sono conservati a -20°C, fino al momento dell' analisi. La determinazione quantitativa delle citochine prodotte è stata effettuata attraverso due metodiche: il saggio immunoenzimatico ELISA (Enzyme Linked ImmunoSorbent Assay) e il saggio citofluorimetrico CBA (Cytometric Bead Array).

STUDIO DEI RECETTORI KIR

Studi recenti hanno dimostrato che i Killer Cell Immunoglobulon-Like Receptor (KIR) - una famiglia di geni polimorfici espressi sulle cellule Natural Killer (NK) e su alcuni linfociti T memoria - sono coinvolti nella

tolleranza ad antigeni "self" e ad antigeni tumorali, in quanto inibiscono le attività effettrici dei linfociti T, sui quali sono espressi. I KIR possono avere un ruolo importante anche nei meccanismi coinvolti nella tolleranza ai trapianti, in particolare, ai trapianti di cellule staminali ematopoietiche (CS) che sono ricchi di cellule presentanti l'antigene (Antigen Presenting Cells) professionali, con alti livelli di molecole del sistema HLA, ligandi per i recettori KIR. I KIR sono codificati da una famiglia di geni sul cromosoma 19 umano, dotata di un alto livello di polimorfismo. I 3 gruppi KIR più importanti riconoscono rispettivamente le molecole HLA-C, con lisina o asparagina in posizione 80, e le molecole HLA-B, con epitopo BW4. Obiettivo di questo progetto è quello di caratterizzare il ruolo funzionale dei KIR, nei meccanismi alla base della tolleranza del trapianto di CSE, nel modello di trapianto di CSE per la talassemia, caratterizzato dalla frequente insorgenza di uno stato di Chimerismo Misto (CM) persistente tra donatore e ricevente. Questa tolleranza potrebbe essere legata a una espansione selettiva di cellule T esprimenti determinate famiglie delle regioni variabili della catena beta del recettore T (TCRV-Beta). Questi linfociti potrebbero rappresentare cellule T all'antigene-specifiche, selettivamente inattivate a causa dell'espressione di un KIR specifico per uno degli antigeni HLA espressi sulle CSE trapiantate. L'apoptosi di questi linfociti T funzionalmente inattivati potrebbe essere selettivamente inibita dallo stimolo persistente con l'alloantigene. ***Caratterizzazione del ruolo funzionale dei Killer Cell Immunoglobulin-Like Receptors (KIR) nei meccanismi alla base della tolleranza al trapianto di CSE*** - è necessario effettuare la tipizzazione genomica a bassa risoluzione dei geni KIR delle coppie donatore-ricevente di trapianto di CSE per la talassemia con Chimerismo misto (CM) persistente. La tipizzazione viene eseguita mediante ibridazione di prodotti di PCR immobilizzati su membrane di nylon, con sonde specifiche marcate in maniera non-radioattiva, specifiche per i vari polimorfismi KIR (PCR-SSOP), secodo i protocolli pubblicati nella letteratura e allestiti presso il Laboratorio IME. Nuovi polimorfismi KIR riscontrati nel corso di questi studi verranno caratterizzati mediante sequenziamento diretto del prodotto di PCR. Si intende inoltre implementare un metodo di tipizzazione ad alta risoluzione del gruppo KIR3DL1, mediante amplificazione sequenza-specifica (PCR-SSP), poichè è stato dimostrato che i polimorfismi allelici di questo gruppo corrispondono a diversi livelli di espressione della molecola CD158e, con alcuni alleli codificanti addirittura per alleli "null", assenti sulla superficie cellulare.

Risultati Preliminari

Rispetto al PIANO SPERIMENTALE sono stati ottenuti i seguenti risultati:

Punto A) Assetto immunologico

Separazione del sangue tramite ficoll, lavaggi, raccolta e conta dei PBMC totali (dove possibile separazione di CD4+ e CD4). L'intervallo di normalità per le singole sottopopolazioni valutato in 3 pazienti, rispetto alle PBMC totali, è il seguente: CD2+ 81±3%, CD3+ 73±5%, CD4+ 46±8%, CD8+ 27±6%, CD19+ 9±5%, CD56+ 11±2%, CD14+ 8±2%, TCR αβ+ 67±5%, TCR γδ+ 3±2%, CD45RA+ 47±1O%, CD45RO+ 44±11%, CD4+/CD25+ 10±7%, CD2+/CD28+ 64±7%.

Punto B) Isolamento dei cloni maggiormente espansi di cellule T in base allo spectrotyping dei geni Vbeta

Separazione di PBMC da Buffy Coat e isolamento di CD4+ e loro clonaggio. Sono state usate due differenti stimolazioni: PHA e αCD3, per ogni condizione 7 piastre con 1 cell/well e 3 piastre con 0,3 cell/well. Controllo: 1 piastra per condizione di cloning efficiency. Si è lasciata produrre la crescita e lo sviluppo dei cloni, successivamente l'ELISA-screening per la determinazione di citochine nel supernatante e la conseguente classificazione di ogni clone in Th0, Th1, Th2 o Tr1. Si è poi provveduto al congelamento dei cloni in DMSO.

Estrazione di RNA da CD4+ provenienti dalle limiting dilution del clonaggio: retrotrascrizione dell'RNA, PCR di controllo del cDNA con β-actina e PCR dei Vβ del TCR. Corsa su gel di agaroso e quindi su gel di poliacrilamide. Estrazione RNA da PBMC di Normal Donor, retrotrascrizione, PCR β-actina e PCR Vβ. Corsa su gel di agaroso e successivamente di poliacrilamide, analisi dei risultati. Questi campioni verranno usati come riferimento in ogni gel di acrilamide dei pazienti (vicino ad ogni Vβ del paziente il Vβ del normal donor) per avere una comparazione immediata della distribuzione dei Vβ, in condizioni normali e in presenza di chimerismo misto.

Punto C) Sistema di read out

In fase di allestimento.

Punto D) Tipizzazione KIR

Estrazione DNA da 5 coppie di pazienti con chimerismo misto, 2 coppie di pazienti con full donor engraftment e 2 coppie di pazienti con graft failure. Allestimento di una reazione di PCR per tutti gli alleli KIR noti. Valutazione delle differenze tra le coppie donatore/ricevente per KIR2DL2/3 in SSP.

Progetto 1B

Titolo - *Terapia genica della β-talassemia: sviluppo di vettori lentivirali per l'espressione regolata di β-globina e utilizzo in modelli pre-clinici*

Razionale - La terapia genica della β-talassemia si propone come alternativa terapeutica al trapianto di midollo allogenico, nei pazienti che non dispongono di un donatore idoneo. La terapia genica della talassemia consiste nel trapianto autologo delle cellule staminali emopoietiche (HSC) del paziente, modificate geneticamente *in vitro*, per esprimere livelli terapeutici di catene β-globiniche. La storia clinica della malattia - e oltre 20 anni di esperienza di trapianto - indicano che anche un modesto aumento della sintesi di β-globina (> 15%) in una frazione (> 25%) degli eritrociti è sufficiente a ridurre l'eritropoiesi inefficace, migliorare il trattamento della malattia e aumentare l'aspettativa di vita dei pazienti. Si può quindi ipotizzare che una strategia di correzione parziale, basata sul trapianto autologo di HSC trasdotte con un vettore virale esprimente un livello sufficiente, e opportunamente regolato, di β-globina, sia in grado di portare a un beneficio terapeutico.

Obiettivi

1. Sviluppare vettori lentivirali ad alto titolo, contenenti elementi di regolazione trascrizionale, derivati da geni eritroide-specifici (LCR della β-globina, GATA1-HS2), in grado di trasdurre HSC $CD34^+$ di pazienti talassemici, e di esprimere appropriati livelli di β-globina specificamente nella progenie differenziata della linea eritroide
2. Ottimizzare protocolli per la trasduzione di cellule $CD34^+$ prelevate dal midollo osseo o di progenitori ottenuti da sangue periferico di pazienti talassemici e controlli sani
3. Sviluppare un modello *in vitro*, per analizzare l'efficacia dei vettori sviluppati nel ridurre la percentuale di precursori eritroidi apoptotici, e nel correggere lo sbilancio sintetico delle catene globiniche. I sistemi utilizzati *in vitro* prevedono l'allestimento di colture liquide di cellule $CD34^+$ differenziate con rhEpo e colture clonogeniche
4. Determinare i siti delle integrazioni lentivirali nel genoma delle cellule tradotte, per l'analisi della genotossicità
5. Sviluppare un modello pre-clinico *in vivo*, per determinare l'efficacia della strategia terapeutica, nel suo insieme, basato sia sul trapianto di HSC murine trasdotte in topi β-talassemici sia sul ripopolamento competitivo di topi NOD/SCID, con HSC trasdotte ottenute da pazienti talassemici

Piano Sperimentale

(A) - Sviluppo di vettori lentivirali eritroide specifici per l'espressione della β-globina umana

1. Clonaggio di vettori lentivirali contenenti LCR di β-globina, in differenti orientamenti all'interno di vettori SIN-18 e nell'LTR di vettori SIN-40; produzione e valutazione del titolo virale
2. Trasduzione di linee cellulari eritroidi HEL e MEL, di cellule CD34+ isolate dal midollo osseo di almeno 5 pazienti talassemici e valutazione della sintesi di β-globina, mediante HPLC nella progenie eritroide indotta a differenziamento in coltura liquida
3. Valutazione della variabilità di espressione, integrazione-dipendente, a livello clonale nelle BFU-E derivate da cellule trasdotte

(B) - Ottimizzazione dei protocolli di trasduzione con vettori lentivirali delle cellule emopoietiche isolate da midollo osseo e sangue periferico

1. Stimolazione in coltura delle cellule di donatori sani e pazienti talassemici, con citochine, e valutazione dell'indice di proliferazione e differenziamento
2. Espansione e induzione del differenziamento eritroide terminale, in colture bifasiche di progenitori eritroidi isolati dal sangue di donatori sani e pazienti talassemici; valutazione della variabilità individuale dei campioni e analisi della riproducibilità
3. Ottimizzazione delle condizioni di trasduzione (diversi cicli di infezione, diversi tempi di infezione, +/- retronectina), con lentivirus esprimenti geni marcatori, per determinare l'efficienza di infezione e analisi al FACS della percentuale e del fenotipo delle cellule trasdotte

(C) - Analisi *in vitro* della correzione dei parametri morfologici, cellulari e di sintesi della β-globina, in cellule trasdotte con lentivirus

1. Colture clonogeniche delle cellule trasdotte e dei relativi controlli, e analisi al FACS delle BFU-E per la valutazione delle cellule HbA^+
2. Analisi in HPLC della sintesi di catena β in BFU-E trasdotte e nei controlli
3. Analisi dell'indice di apoptosi, mediante l'analisi al FACS della percentuale di cellule Annexin V^+, in colture di cellule talassemiche trasdotte, non trasdotte e controlli normali
4. Analisi morfologica dei globuli rossi presenti al termine della fase differenziativa delle colture bifasiche

(D) - Analisi dei siti di integrazione del vettore lentivirale nel genoma delle cellule trasdotte

1. Trasduzione di cellule $CD34^+$ isolate dal midollo osseo di pazienti talassemici, con vettori lentivirali, per l'espressione della β-globina, ed espansione *in vitro* delle cellule trasdotte per l'estrazione del DNA
2. LM-PCR e sequenziamento di 200 cloni contenenti il provirus integrato
3. Analisi bioinformatica dei siti di inserzione, analisi comparata del profilo molecolare di cellule differenziate da progenitori eritroidi di pazienti e controlli normali

(E) - Sviluppo di modelli pre-clinici per la valutazione dell'efficacia *in vivo* della terapia genica

1. Isolamento di cellule del fegato fetale di topi th3/th3, trasduzione con il vettore lentivirale ottimale, sviluppato al punto A, e analisi dell'efficienza di trasduzione (Southern blot analisi, saggio clonogenico e FACS HbA^+ delle BFU-E)
2. Trapianto, in riceventi C57 letalmente irradiati, delle cellule trasdotte e relativi controlli
3. Analisi a tempi diversi (1-6 mesi) di: sopravvivenza; % cellule HbA^+ nel sangue; HCT, Hb; % reticolociti; morfologia globuli rossi; sintesi di catena β per HPLC; istopatologia della milza e del fegato
4. Trasduzione di cellule $CD34^+$ da midollo osseo di pazienti talassemici, trapianto in NOD/scid irradiati subletalmente e splenectomizzati
5. Analisi del chimerismo uomo/topo (cellule umane $CD45^+$) nei topi NOD/scid trapiantati, delle cellule HbA^+ in PB e BM, saggio clonogenico e analisi delle BFU-E umane trasdotte, per valutare la variabilità di espressione a livello clonale

Risultati preliminari

Rispetto al PIANO SPERIMENTALE, sono stati ottenuti i seguenti risultati:

Punto A) Sviluppo di vettori lentivirali eritroide specifici per l'espressione della β-globina umana

Sono state sviluppate strategie per il targeting trascrizionale di vettori oncoretrovirali (MLV-derivati) e lentivirali (HIV-derivati) basandosi sulla sostituzione di elementi di controllo della LTR virale, con

sequenze derivanti da enhancer e promotori cellulari (enhancer HS1 e HS2 del gene eritroide-specifico GATA-1).

Le LTR modificate sono state utilizzate per guidare l'espressione del cDNA codificante la beta-globina. Un secondo gene reporter (LNGFR) è stato posto sotto il controllo del promotore costitutivo PGK, allo scopo di monitorare l'efficienza di trasduzione e di immunoselezionare le cellule.

Punto B) Ottimizzazione dei protocolli di trasduzione con vettori lentivirali delle cellule emopoietiche isolate da midollo osseo e sangue periferico

Le linee cellulari eritroblastiche umane e murine (HEL e MEL) - che esprimono rispettivamente le globine endogene alpha/gamma umane e alpha/beta murine - sono state trasdotte con i vettori lentivirali (LV) o retrovirali (RV).

Punto C) Analisi *in vitro* della correzione dei parametri morfologici, cellulari e di sintesi della β-globina in cellule trasdotte con lentivirus

In seguito a induzione eritroide, si è ottenuto accumulo di beta-globina umana, nelle linee cellulari MEL ed HEL, a un livello comparabile con quello delle globine endogene. Il targeting trascrizionale della LTR si è dimostrato una strategia efficiente, in grado di garantire la produzione di beta-globina di origine virale ristretta alla progenie eritroide delle HSC trasdotte. Nel tentativo di migliorare l'efficienza globale dell'espressione della beta-globina, diversi elementi naturalmente presenti nel gene della beta-globina (introni, regioni non tradotte) sono stati inseriti all'interno dei vettori.

Abbiamo quindi messo a punto, nell'ambito dei vettori retrovirali, un sistema che sfrutta la capacità di una proteina di HIV, Rev, di legarsi agli RNA contenenti la sequenza RRE (Rev Responsive element) permettendone il trasporto dal nucleo al citoplasma.

Allo scopo di prevenire lo splicing dell'RNA virale che avviene durante la produzione del vettore, la sequenza di packaging dei vettori retrovirali (PSI) e l'elemento RRE sono stati inseriti nel primo o nel secondo introne della beta-globina. Le "packaging cells" sono cotrasfettate con il "transfer vector" e il plasmide codificante Rev.

Questo nuovo sistema si è dimostrato efficace nei vettori retrovirali e verrà esportato nell'ambito dei lentivirus. Nuovi vettori lentivirali contenenti diversi elementi trascrizionali eritroidi specifici (LCR, promotore della beta-globina) saranno generati e testati, per la loro capacità di conferire alti livelli di espressione del transgene, ristretta alla linea eritroblastica. I vettori selezionati saranno usati per trasdurre cellule ematopoietiche di pazienti talassemici e il potenziale terapeutico di queste cellule trasdotte sarà valutato in appropriati modelli pre-clinici (trapianti in topi NOD SCID e trapianti di midollo nei topi beta-talassemici).

Progetti di ricerca clinica

Indicatori di output: n. 2 Progetti di ricerca clinica in partnership elaborati e definiti dalle parti

Nel periodo oggetto della presente Relazione sono stati elaborati due progetti di ricerca clinica in partnership con l'IRCCS Fondazione Centro San Raffaele del Monte Tabor di Milano, e definiti i termini e le condizioni della stessa collaborazione. Si riportano di seguito, in sintesi, gli elementi costitutivi dei progetti.

Progetto 2A

Titolo Progetto - *Immunoterapia adottiva con cellule T regolatorie in pazienti talassemici trapiantati con cellule staminali aploidentiche di origine materna*

Partner - IRCCS Fondazione Centro San Raffaele del Monte Tabor di Milano

Responsabilità clinico-scientifica – Prof. Guido Lucarelli per la Fondazione IME; Prof.ssa Maria Grazia Roncarolo per l'IRCCS Fondazione Centro San Raffaele del Monte Tabor.

Sede - Lo studio verrà condotto in gran parte a Milano presso il reparto UTMO dell'HSR e nella sede dell'Istituto San Raffaele Telethon per la Terapia Genica.

Razionale - Al momento attuale la sola cellula staminale normale utilizzabile per portare dentro il midollo osseo "vuoto" del ricevente talassemico il gene normale è di provenienza allogenica.
Il pool di donatori disponibili per il trapianto di cellule staminali è del 25-30%, considerando quelli familiari HLA identici, e può essere ampliato al 40-45% con l'uso di donatori non familiari HLA identici: tuttavia, gran parte dei pazienti risulta priva di donatore.
La percentuale dei donatori può essere ancora sensibilmente aumentata, utilizzando donatori familiari aploidentici, disponibili nella quasi totalità dei casi.
Il trapianto di midollo da donatore aploidentico deve venire eseguito seguendo protocolli particolari (vedi protocollo PC30 aplomadre).
Il protocollo attualmente utilizzato nell'ambito del trapianto di cellule staminali nella Talassemia prevede l'impiego di una megadose di cellule staminali, raccolte dalla madre del paziente mediante aferesi, dopo mobilizzazione delle cellule staminali dal sangue periferico. Nell'ambito dei donatori aploidentici, infatti, la madre risulta essere la più idonea, al fine di ridurre l'incidenza di GVHD. Detto ciò, secondo dati preliminari sui pazienti recentemente trattati, sussiste una certa percentuale di rigetto non controllabile dall'attuale protocollo. Inoltre, dopo tali trapianti, il paziente è sottoposto a terapia immunosoppressiva, che comporta un aumento della morbilità per infezione.

Presso l'HSR-TIGET di Milano è stato definito un protocollo di terapia cellulare mediante infusione di cellule regolatorie, da associare al trapianto di midollo aploidentico, al fine di prevenire la GVHD, inducendo una tolleranza specifica per la disparità antigenica e di lunga durata. Secondo tale protocollo, le cellule T del donatore vengono rese tolleranti *in vitro* verso gli antigeni allogenici del ricevente, mediante una breve manipolazione in presenza di IL-10, potente citochina immunosoppressiva. Le cellule così ottenute vengono poi infuse nei pazienti trapiantati, ad attecchimento avvenuto delle cellule mieloidi.

In vitro è stato dimostrato che le colture rese tolleranti in presenza di IL-10, contengono i precursori delle cellule T regolatorie che, una volta *in vivo*, sarebbero in grado di espandersi e di indurre uno stato di tolleranza duraturo, a sua volta mediato dall' IL-10.

Le cellule rese tolleranti in presenza di IL-10 - nonostante non rispondano più agli allo antigeni - preservano la loro capacità di rispondere ad antigeni diversi, quali virali o batterici, e costituiscono pertanto una protezione per i pazienti nel periodo postrapianto, che precede la ricostituzione immunologica. Tale terapia cellulare è attualmente in corso di sperimentazione presso l'HSR-TIGET, secondo un protocollo a dosi cellulari crescenti, approvato dal Ministero della Sanità e applicato a pazienti affetti da patologie oncoematologiche, sottoposti a trapianto aploidentico da donatore familiare.

Obiettivi

- Ridurre l'incidenza di GVHD acuta e cronica e del rigetto del trapianto in pazienti talassemici sottoposti a trapianto aplomadre, attraverso l'induzione di un meccanismo di tolleranza a lungo termine, riducendo significativamente o eliminando la necessità di ricorrere a terapia immunosoppressiva.
- Migliorare l'immunoricostituzione e, quindi, ridurre il rischio infettivo post-trapianto.

Piano Sperimentale - Il piano sperimentale prevede l'arruolamento di 8 pazienti IME in due anni (selezionati dal Prof. Lucarelli) da sottoporre a trapianto e per i quali verranno previamente preparate in GMP le cellule anergizzate in presenza di IL-10.

Tale protocollo di anergizzazione prevede:

- prelievo delle cellule del donatore e del ricevente pre-trapianto (tramite aferesi o buffy coats);
- coltura in vitro delle stesse per 10 giorni in presenza di IL-10;
- tests di validazione e congelamento o infusione a fresco.

I pazienti riceveranno il trapianto di cellule staminali da madre, secondo il protocollo dell'IME e successivamente (circa un mese dopo) ad attecchimento avvenuto, l'infusione di cellule anergizzate. Le infusioni prevedono l'utilizzo di dosi scalari di cellule T CD3+/kg anergizzate con IL-10 (1ª dose: 10^5/kg; 2ª dose: $3x10^5$/kg; 3ª dose: 10^6/kg; 4ª dose: $3x10^6$/kg).

Gli "endpoints" principali del protocollo sono: assenza di aplasia midollare e assenza di reazioni avverse; quelli secondari includono una diminuita incidenza di GVHD e/o rigetto con possibilità di riduzione o eliminazione della terapia immunosoppressiva e l'immunoricostituzione, con diminuzione degli episodi

infettivi post trapianto. Gli "endpoints" biologici comprendono la possibilità di valutare la presenza di cellule T regolatorie e di citochine regolatorie nei pazienti trattati.

Progetto 2B

Titolo Progetto - *Messa a punto di un protocollo di immunoterapia adottiva con cellule T regolatorie in pazienti talassemici trapiantati con cellule staminali HLA identiche da donatore non famigliare (MUD)*

Partner - IRCCS Fondazione Centro San Raffaele del Monte Tabor di Milano

Responsabilità clinico-scientifica – Prof. Guido Lucarelli per la Fondazione IME; Prof.ssa Maria Grazia Roncarolo per il IRCCS Fondazione Centro San Raffaele del Monte Tabor

Sede - Lo studio verrà condotto in gran parte a Milano presso il reparto UTMO dell'HSR e nella sede dell'Istituto San Raffaele Telethon per la Terapia Genica.

Razionale - Si prevede l'estensione del protocollo di immunoterapia adottiva anche a pazienti che ricevono un trapianto MUD, che a tutt'oggi sono ancora soggetti ad una elevata incidenza di GVHD cronica. Gli obiettivi ed il piano sperimentale sono simili a quelli descritti per i pazienti che hanno ricevuto un trapianto aplomadre (vedi Progetto di ricerca clinica *Immunoterapia adottiva con cellule T regolatorie in pazienti talassemici trapiantati con cellule staminali aploidentiche di origine materna*).
Tuttavia, il presente protocollo prevede una modifica nella procedura di anergizzazione.
In particolare, verranno utilizzate come APC le cellule dendritiche immature del ricevente indotte *in vitro* in presenza di IL-10.

Piano Sperimentale - Il piano sperimentale prevede l'arruolamento di un totale di 8 pazienti IME in due anni (selezionati dal Prof. Lucarelli) da sottoporre a trapianto e per i quali verranno previamente preparate in GMP le cellule anergizzate in presenza di cellule dendritiche immature e IL-10. Un piano sperimentale più dettagliato verrà definito una volta eseguiti gli esperimenti preliminari previsti nel progetto di ricerca base "*Ruolo delle cellule T regolatorie nell'indurre e/o mantenere uno stato di tolleranza immunologica, in pazienti talassemici con chimerismo misto persistente dopo TMO*" (già in partnership tra IME e San Raffaele).

Ricerca informatico/tecnologica

Indicatori di output: n. 1 Progetti di ricerca informatico-tecnologica avviato e in corso di realizzazione; n. 1 Progetto di collaborazione con Centro nazionale trapianti

Progetto dell'Infrastruttura Tecnologica e Informativa della Fondazione IME

Nel periodo oggetto della presente *Relazione* è stata realizzata attività di ricerca e sviluppo, condotta dal gruppo professionale I&CT di IME, e collegata al mandato di realizzare elementi costitutivi della infrastruttura di supporto informativo alla rete nazionale e internazionale.

L'attività in oggetto ha riguardato sia gli aspetti prettamente tecnici - relativi alla fase progettuale e realizzativi - sia la definizione di accordi per la collaborazione con altri soggetti pubblici e privati, tesa verso il conseguimento delle finalità poste.

ASPETTI TECNICI E TECNOLOGICI

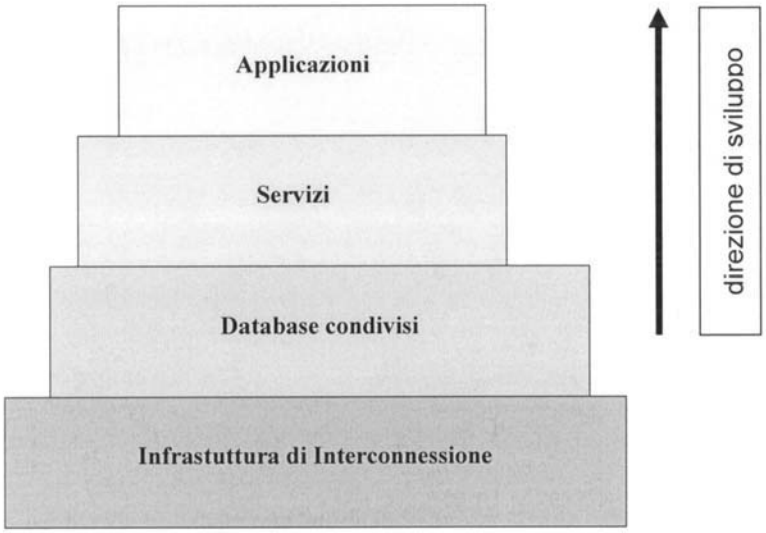
La progettazione di un sistema complesso di rete ha comportato la necessaria individuazione di un metodo, ovvero di un percorso progettuale, per guidare la scansione delle realizzazioni, mantenendo la coerenza tecnologica e informatica d'insieme.

Detto percorso è stato accompagnato da una serie di scelte sugli standard tecnologici (protocolli, sistemi operativi, database, formati dati e immagini, etc.), da mantenere uniformi per tutte le future realizzazioni della rete.

La definizione di "layers" di Progetto sovrapposti, ha individuato la sequenza di implementazione dei supporti tecnologici, dei database informativi condivisi, dei servizi comuni e distribuiti e, infine, delle specifiche applicazioni.

Il percorso metodologico adottato è indicato dallo schema seguente.

Figura 1 – Metodo per lo sviluppo della rete informatico-informativa della Fondazione IME



Il Documento di rendicontazione allegato alla presente relazione (Allegato 1) riferisce delle attività di sviluppo e ricerca effettuate, per l'esecuzione e l'attivazione del sistema descritto dal Progetto dell'Infrastruttura Tecnologica e Informativa della Fondazione IME.

In detto documento sono ripercorse le linee guida del progetto, riportandone di volta in volta i dettagli tecnici e le scelte realizzative compiute, a tutto novembre 2004.

ACCORDI DI COLLABORAZIONE

Nell'ambito della realizzazione di una rete tecnologica per supportare le attività di cura, formazione e ricerca nel campo dell'ematologia, la Fondazione IME ha attivato contatti con gli enti che a livello nazionale sviluppano attività similari, al fine di definire le possibili collaborazioni, attraverso la condivisione di progetti e risorse, economiche e professionali.

Il confronto ha riguardato:

- sia soggetti pubblici, operanti nell'ambito del sistema sanitario nazionale, come:
  - CNT (Centro Nazionale Trapianti), ente per il monitoraggio di tutte le attività di trapianto in Italia, emanazione dell'Istituto Superiore di Sanità;
  - NITp – North Italian Transplant programme – ente creato per il coordinamento di tutte le attività di trapianto (liste di attesa, donazione, allogazione, trapianto, follow up) riferibili a un gruppo di regioni del centro-nord;
- sia soggetti privati, operanti nel settore delle telecomunicazioni, telemedicina e bio-tecnologie come:
  - TelBios Spa, società leader in Italia nel settore della telemedicina, che annovera tra i suoi soci Telecom Italia Spa, Alenia Spazio e il San Raffaele di Milano. TelBios ha già avviato con il gruppo del Prof. Mandelli una sperimentazione per collegare in telemedicina la Sezione di Ematologia

dell'Università degli Studi di Roma "La Sapienza" e l'Ospedale Al-Mansour di Baghdad, centro di riferimento iracheno per le malattie ematologiche;

- Health Ricerca & Sviluppo Srl, società che è stata costituita come espressione di "spin-out" accademico dell'Alma Mater Studiorum dell'Università di Bologna;
- e-Heart Srl, società che è stata costituita in qualità di "spin-out" accademico della Facoltà di Ingegneria dell'Università degli studi di Ferrara.

Progetto di collaborazione IME-CNT

Aree di interesse comune

Entrambi gli Enti agiscono sulla base di un modello organizzativo di rete, coinvolgendo nelle proprie attività operative diversi soggetti che, a vario titolo, concorrono al processo di trapianto.

Questo modello organizzativo deve trovare necessario riscontro in una infrastruttura informativa e informatica che assicuri i seguenti obiettivi:

- disponibilità di una infrastruttura per l'interconnessione a banda larga, che garantisca agevole connettività e servizi a tutti gli attori;
- identificazione univoca di tutti i pazienti, i donatori e gli attori sanitari operanti sulla rete;
- raccolta, elaborazione e re-distribuzione di tutte le informazioni relative al processo di trapianto di organo solido, ovvero di midollo osseo;
- gestione caratteristica dei processi (donazione, trapianto, follow-up), dal punto di vista sia clinico sia laboratoristico;
- valutazione clinico-scientifica ed elaborazione statistica dei dati;
- servizi di tele e video comunicazione tra gli attori sanitari, per la conduzione congiunta di fasi del processo, nonché per la *second opinion.*

Ciascuno dei due Enti dispone già, ovvero sta progettando e realizzando, applicazioni e soluzioni specifiche, per rispondere a dette necessità.

La particolare fase di sviluppo, in cui si trovano i progetti, rende possibile l'effettuazione:

- di acquisizioni congiunte di infrastruttura di interconnessione, per migliorare l'accessibilità al sistema da parte di tutti gli attori e moltiplicare le opportunità di servizio;
- di scelte tecnologiche concordate per facilitare l'acquisizione, lo sviluppo e l'utilizzo congiunto di prospettiva delle soluzioni applicative;
- di progettare congiuntamente strutture di dati comuni, in particolare per la gestione degli aspetti clinico-scientifici;
- di sviluppare congiuntamente applicazioni "verticali" nell'ambito del processo di trapianto.

Connettività

La disponibilità diffusa a livello territoriale della connettività alla rete rappresenta il primo step di ingresso negli assetti organizzativi dei due Enti.

È importante che la connettività di rete sia "aperta e distribuita", senza ricalcare nella propria architettura assetti "gerarchici" dal punto di vista istituzionale, che ne limitano forzatamente l'utilizzo e lo sviluppo.

L'esistenza di reti "chiuse", ancorché motivate in passato da ragioni di sicurezza, può essere superata dalla creazione di VPN (reti ad accesso riservato a particolari utenti pre-definiti), di fatto aperte e flessibili, e con livelli di sicurezza comunque garantiti.

Sviluppando un accordo congiunto con uno dei carrier nazionali, corredato da eventuali partnership tecnologiche nazionali/internazionali, nel campo delle telecomunicazioni, i due Enti possono aprire opportunità comuni di distribuzione della connettività a larga banda, ipotizzando anche il necessario utilizzo delle reti già esistenti.

Datawarehouse

Al di là delle scelte di soluzioni applicative che ciascun Ente ha ritenuto, ritiene o riterrà di condurre, è opportuno rendere fruibili, in maniera orizzontale, i consistenti flussi di dati generati dal processo di trapianto, dagli sviluppi della ricerca e dal loro monitoraggio.

Si tratta infatti di flussi informativi rilevanti, sia dal punto di vista clinico-scientifico sia epidemiologico, che se gestiti in modalità datawarehouse potrebbero offrire importanti opportunità di rielaborazione, interpretazione, estrazione, etc., che in modalità "web" potrebbero essere offerte e distribuite su tutta la rete.

Per raggiungere questo obiettivo, occorre condurre un attento studio preventivo sul potenziale di "data management" contenuto all'interno degli attuali sistemi informativi, per generare poi i percorsi relativi ai flussi informativi rilevanti per la costruzione del datawarehouse comune.

Applicazioni verticali

Le possibilità di collaborazione si estendono in via operativa anche allo sviluppo congiunto di applicazioni specifiche, come ad esempio:

- la gestione del processo di trapianto (donazione, trapianto, follow-up);
- la gestione operativa del work-flow caratteristico del laboratorio di immunogenetica;
- le soluzioni di telemedicina da utilizzare e.g. per il processo di donazione, nelle attività cliniche di trapianto o nella second opinion in generale;
- lo sviluppo di servizi innovativi di video e telecomunicazione, per integrare al meglio le attività dei singoli nodi della rete.

IME e CNT sono potenzialmente interessati allo sviluppo di queste soluzioni, mettendo in comune competenze ed esperienze, ottimizzando gli aspetti tecnologici, e non ultimo, quelli economici.

Assetti gestionali – Necessità e prospettive

Nel prospettare nuove soluzioni tecnologiche per l'integrazione su rete di attività sanitarie è opportuno porsi, sin dall'inizio la questione della gestione a regime dei sistemi e delle applicazioni.

Al procedere della complessità e al moltiplicarsi delle competenze necessarie, spesso le risorse professionali (ed economiche) dei singoli enti possono risultare insufficienti o semplicemente inadeguate.

Sono state quindi discusse, sin dalla fase iniziale, alcune questioni riguardanti:

- le partnership tecnologiche da attivare, sia a livello di telecomunicazioni (carrier nazionali/internazionali) sia a livello di sviluppo di applicazioni SW;
- il livello di outsourcing atteso, per definire le aree di gestione da considerare comunque "interne" a ciascun singolo ente;
- la possibilità di creare uno strumento gestionale *ad hoc* (ad esempio un consorzio) che conduca operativamente le fasi di progettazione, realizzazione e gestione, sulla base degli indirizzi forniti dai tre enti.

L'ipotesi di creare un consorzio *ad hoc* andrebbe ovviamente supportata da un piano industriale di periodo, che evidenzi le criticità/opportunità gestionali.

Nella valutazione di prospettiva, occorre considerare che l'obiettivo a regime è quello della gestione di tutti i flussi informativi nazionali, relativi a qualunque tipo di trapianto, sia di organo solido sia di midollo osseo, con soluzioni aperte alla collaborazione/integrazione con altre realtà nazionali e internazionali.

Sottoscrizione di una lettera di intenti IME-CNT e sviluppo progetti

In data 4 ottobre 2004 IME e CNT hanno sottoscritto una Lettera di Intenti che, richiamando i campi di possibile collaborazione sopra enunciati, esplicita e formalizza la volontà di entrambi i soggetti a procedere nell'approfondimento tecnico ed economico dei progetti da sviluppare insieme, e precisamente:

- **Sperimentazione di VPN su Internet a larga banda per connettività flessibile e sicura tra i nodi della rete trapianti** (soggetti coinvolti IME, CNT, SIT, CIR)
- **Sviluppo di un modello di database comune per i flussi informativi del percorso di trapianto** (soggetti coinvolti IME, CNT)
- **Soluzioni di integrazione tra i sistemi informativi per la gestione del percorso di trapianto** (Soggetti coinvolti IME, CNT, NIT, Società SW)
- **Soluzioni innovative di *Office Automation* e di videocomunicazione** (soggetti coinvolti IME, CNT)

Ricerca organizzativa-gestionale

Indicatori di output: n. 1 progetto di ricerca organizzativa-gestionale concluso; n. 2 progetti di ricerca organizzativo-gestionale avviati e in corso di realizzazione; n. 1 progetto di ricerca interdisciplinare (clinica e gestionale) in partnership, avviato e in corso di svolgimento

Progetto "Modello di pianificazione strategica"

Nella prima fase di vita della Fondazione IME è stata svolta attività di ricerca e sviluppo in ambito organizzativo e gestionale, rivolta principalmente alla progettazione e successiva prima implementazione di un sistema innovativo e integrato di pianificazione strategica, programmazione e controllo.

L'attività di pianificazione strategica si è configurata quale vero e proprio progetto, che ha coinvolto in un periodo di circa 4 mesi, e in ottica integrata e interdisciplinare, le diverse aree e professionalità/competenze di IME.

Razionale e obiettivi

Le esigenze e le finalità da cui ha tratto origine il progetto sono così sintetizzabili:

- la necessità di realizzare, in un contesto di incertezza e di avvio di una organizzazione, una pianificazione a più livelli di approfondimento, che traduca il complesso mandato di IME, da un lato, in una estrinsecazione delle linee guida generali, per IME e per le sue articolazioni e Aree di Risultato (AdR), e dall'altro, in una dettagliata e operativa esplicitazione:
    - dello "scenario" epidemiologico, biostatistico e demografico (domanda) entro cui muovere in termini strategici e programmati la "capacità di offerta" della Fondazione IME;
    - degli obiettivi di breve e medio periodo, e dei *target-output* attesi, per AdR;
    - delle modalità organizzative e gestionali individuate;
    - della scansione temporale delle attività nello scenario dato, mantenendo la necessaria e indispensabile dinamicità e flessibilità nell'ottica dell'orientamento ai risultati, a fronte del contesto mutevole e incerto;
- la necessità di definire i modelli organizzativi delle reti nazionali ed internazionali, il sistema delle responsabilità e le aree di risultato, i sistemi di indicatori di controllo, secondo il metodo focalizzato sulle attività (*activity based management*) così da poter successivamente disporre di un "cruscotto" direzionale sull'andamento della gestione e delle attività, e conformemente al D.Lgs. 288/03 in riferimento allo scopo di mandato di essere riconosciuti quale IRCCS-IME;
- l'opportunità di sperimentare un modello di pianificazione multidimensionale, ispirato alla logica della *Balanced Scorecard*, che partendo dalla prospettiva del "cliente" (pazienti e soggetti istituzionali) individui e definisca obiettivi e modalità organizzative nella prospettiva "interna" (processi gestionali e relative performance, per area di risultato e centri di responsabilità);
- disporre di un documento di esplicitazione e formalizzazione di linee strategiche, obiettivi e *target* di medio periodo, che costituisca elemento di condivisione all'interno dell'Organizzazione, e comunicazione all'esterno, del percorso e delle mete che si intendono raggiungere.

Metodo

Il primo Piano Strategico della Fondazione IME è il risultato di un lavoro di équipe interdisciplinare, conseguente alla natura plurale, sia dello scopo di IME sia degli interventi specialistici da porre in essere, previa pianificazione (allineamento teleologico) e progettazione operativa.

Il curatore del Piano è intervenuto per orientare strategicamente le varie parti e intessere il "filo" dell'unitarietà dell'Organizzazione, ovvero il significato univoco della Mission di IME. Dal punto di vista dello stile linguistico e dei metodi, ci si è attenuti il più possibile al rispetto del valore intrinseco dei singoli contributi, in quanto imporre l'assoluto dell'uniformità di stile rischia di tradire le conoscenze/competenze, e imporre l'assolutismo metodologico rischia di invertire il segno stesso del metodo, trasformandolo nel fine. La ricerca del metodo – che tra l'altro nel Piano ha sempre valenza espositiva - è condizione a priori del porsi professionalmente nell'ottica strategica e ha esiti differenziati, adeguati alla materia trattata.

Il Piano ha una composizione a moduli, che consente una lettura a più livelli di approfondimento, sia verticale sia orizzontale. Ogni modulo (capitolo; paragrafo) ha una sua autonomia contenutistica, che mantiene in sé l'intero significato della Fondazione, e strumentalmente rappresenta una possibile scomposizione in schede divulgative, per "interesse". Il livello orizzontale di lettura è ideato in modo da rimandare a lato:

- le puntualizzazioni di periodo, le esemplificazioni, i rinvii ad altre parti del documento, le traduzioni operazionali conseguenti l'azione di piano (obiettivi operativi, progetti di studio, di ricerca e di settore, per cui si rimanda a documenti puntuali, misure e indicatori);
- le citazioni autoriali, ovvero testualmente di norme;
- segnalazione/ripresa dell'argomento trattato.

Risultati ottenuti

L'output del progetto è costituito dal Piano Strategico 2004-2007 della Fondazione IME. Il documento è stato consegnato, come da tempogramma predefinito, ad aprile 2004.

Progetto di Ricerca interdisciplinare

Titolo Progetto - *Prima sperimentazione su obiettivi concreti del potenziale di IME e GIMEMA nella realizzazione del Dipartimento Epidemiologico, Biostatistico e di Information Tecnology: ricerca e sviluppo di strumenti ICT, a supporto della ricerca di base e clinica, con particolare riferimento a studi e trial clinici*

Partner - Fondazione GIMEMA

Responsabilità scientifica – Dott.ssa Anna Darchini, per la Fondazione IME; Dott. Marco Vignetti, per la Fondazione GIMEMA