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

Rendiconto 5 per mille ANNO 2024
Contributo percepito € 1.732.748,66 in data 02/10/2025

Ente della Ricerca Sanitaria
Denominazione Ente: IRCCS Istituto Clinico Humanitas
Codice fiscale: 10125410158
Sede legale: via Manzoni 56 – 20089 – Rozzano (MI)
Indirizzo di posta elettronica dell'ente:
direzione.generale@humanitas.it
Humanitasmirasole@legalmail.it
Dati del rappresentante legale: Ing. Riccardo Bui

Titolo del progetto: Microambiente, Immunità e Imaging Intravitale In Vivo

Data di inizio progetto: 01/01/2025	**Data di fine progetto**: 31/12/2025
Fondi 5 per mille assegnati al progetto: **€ 856.545,52**	**Di cui:** **Quota da sostenere entro l'anno di rendicontazione: € 554.029,76** **Quota accantonata, da sostenere, per progetti pluriennali (durata massima tre anni): € 302.515,76**

VOCI DI SPESA	**Quota da sostenere entro l'anno di rendicontazione**	**Quota accantonata, da sostenere, per progetti pluriennali (durata massima tre anni)**
Personale di ricerca (borsista, a contratto e di ruolo in quota parte)	0,00	140.229,49

Apparecchiature (ammortamento, canone di locazione/leasing)	481.765,01	106.069,20
Materiale d'uso destinato alla ricerca (per laboratori di ricerca, acquisto farmaci ecc.)	0,00	0,00
Spese di organizzazione (manifestazioni e convegni, viaggi e missioni ecc.)	0,00	0,00
Elaborazione dati	0,00	0,00
Spese amministrative	72.264,75	56.217,08
Altro (N/A)	0,00	0,00
TOTALE	**554.029,76**	**302.515,76**

Data, 12/08/2026

Il Responsabile del Progetto

Il Legale Rappresentante

Si autorizza al trattamento dei dati ai sensi del d.lgs. 196/2003

Il Legale Rappresentante

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

Rendiconto 5 per mille ANNO 2024
Contributo percepito € 1.732.748,66 in data 02/10/2025

Ente della Ricerca Sanitaria
Denominazione Ente: IRCCS Istituto Clinico Humanitas
Codice fiscale: 10125410158
Sede legale: via Manzoni 56 – 20089 – Rozzano (MI)
Indirizzo di posta elettronica dell'ente:
direzione.generale@humanitas.it
Humanitasmirasole@legalmail.it
Dati del rappresentante legale: Ing. Riccardo Bui

Titolo del progetto: Microambiente, Immunità e Imaging Intravitale In Vivo

La ricerca in Humanitas è mirata alla comprensione dei meccanismi molecolari dell'immunità e alla base della connessione infiammazione-cancro (Mantovani et al, Nature 2008; Balkwill e Mantovani, Lancet 2001; Biswas e Mantovani, Nature Immunol 2010). Il microambiente tumorale è un ecosistema complesso in cui cellule maligne e non maligne cooperano e interagiscono determinando la progressione del cancro. L'abbondanza, il fenotipo e la localizzazione delle cellule del microambiente variano nel corso dello sviluppo del tumore e in risposta agli interventi terapeutici. Pertanto, aumentare la nostra conoscenza dei cambiamenti spazio-temporali nell'architettura dell'ecosistema tumorale è importante per comprendere meglio lo sviluppo eziologico delle malattie neoplastiche. Inoltre, parte predominante dell'acquisizione della tecnologia in Humanitas mira a coprire una progettazione finalizzata agli studi di patologie associate al sistema immunitario che sono in relazione con il sistema nervoso e vascolare.
Analisi intravitali condotte grazie all'acquisizione del Microscopio 2-fotoni STELLARIS - Falcon ha permesso di valutare in modelli murini di cancro la relazione esistente tra il comportamento di sottotipi di cellule del sistema immunitario con le cellule tumorali entrambi "etichettate" con fluorescenza, principalmente nel contesto del fibrosarcoma. Il campo applicativo di riferisce allo sviluppo di tecnologia ottica a fluorescenza nell'ambito oncologico e mirato al targeting in vivo di cellule del microambiente tumorale con messa a fuoco sul ruolo dei macrofagi nella progressione del cancro. Sono in espansione sviluppi di nuovi metodi di visualizzazione e misurazione del comportamento del sistema immunitario rilevanti nella progressione della malattia in modelli sperimentali del tumore del pancreas e del colon.
Un diverso ambito immunologico in cui è stato utilizzato il sistema Microscopio 2-fotoni STELLARIS -Falcon ha portato alla valutazione della risposta delle cellule immunitarie in modelli locali di infezione con batteri rilevanti nello sviluppo della sepsi associata a

coagulazione intravascolare disseminata in animali geneticamente modificati con il fine di svelare i meccanismi alla base della intersecazione tra immunità innata ed emostasi. Un ultimo campo applicativo è neurologico con lo sviluppo di analisi intravitali di misurazione di flussi di calcio e mediatori delle risposte cellulari in preparati di cervello ottenuti da topi geneticamente modificati. In relazione a questo ultimo punto, analisi ottiche a fluorescenza in parallelo e nel tempo sono state effettuate in cellule neuronali geneticamente modificate ed isolate in vitro, cresciute come “organoidi” al fine di studiare gli stessi meccanismi di risposta a mediatori di infiammazione in un contesto il più vicino possibile all’ambiente fisiologico mediante il sistema THUNDER Imaging-Live cell microscope. La stessa tecnologia è alla base di protocolli e metodi attualmente in sviluppo che valutano la crescita e la struttura di organoidi derivati da pazienti affetti dal tumore del pancreas e la lori risposta e farmaci, con il fine di identificare possibili nuove strategie combinate nel trattamento del tumore primario e la sua progressione nella disseminazione.

Data, 12/08/2026

Il Responsabile del Progetto

Il Legale Rappresentante

Si autorizza al trattamento dei dati ai sensi del d.lgs. 196/2003

Il Legale Rappresentante

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

Rendiconto 5 per mille ANNO 2024
Contributo percepito € 1.732.748,66 in data 02/10/2025

Ente della Ricerca Sanitaria
Denominazione Ente: IRCCS Istituto Clinico Humanitas
Codice fiscale: 10125410158
Sede legale: via Manzoni 56 – 20089 – Rozzano (MI)
Indirizzo di posta elettronica dell'ente:
direzione.generale@humanitas.it
Humanitasmirasole@legalmail.it
Dati del rappresentante legale: Ing. Riccardo Bui

Titolo del progetto: Patologia Digitale, Big Data & HPC

Data di inizio progetto: 01/01/2025	**Data di fine progetto**: 31/12/2025
Fondi 5 per mille assegnati al progetto: **€ 164.705,88**	**Di cui:** **Quota da sostenere entro l'anno di rendicontazione: € 0,00** **Quota accantonata, da sostenere, per progetti pluriennali (durata massima tre anni): € 164.705,88**

VOCI DI SPESA	Quota da sostenere entro l'anno di rendicontazione	Quota accantonata, da sostenere, per progetti pluriennali (durata massima tre anni)
Personale di ricerca (borsista, a contratto e di ruolo in quota parte)	0,00	0,00

Apparecchiature (ammortamento, canone di locazione/leasing)	0,00	140.000,00
Materiale d'uso destinato alla ricerca (per laboratori di ricerca, acquisto farmaci ecc.)	0,00	0,00
Spese di organizzazione (manifestazioni e convegni, viaggi e missioni ecc.)	0,00	0,00
Elaborazione dati	0,00	0,00
Spese amministrative	0,00	24.705,88
Altro (N/A)	0,00	0,00
TOTALE	**0,00**	**164.705,88**

Data, 12/08/2026

Il Responsabile del Progetto

Il Legale Rappresentante

Si autorizza al trattamento dei dati ai sensi del d.lgs. 196/2003

Il Legale Rappresentante

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

Rendiconto 5 per mille ANNO 2024
Contributo percepito € 1.732.748,66 in data 02/10/2025

Ente della Ricerca Sanitaria
Denominazione Ente: IRCCS Istituto Clinico Humanitas
Codice fiscale: 10125410158
Sede legale: via Manzoni 56 – 20089 – Rozzano (MI)
Indirizzo di posta elettronica dell'ente:
direzione.generale@humanitas.it
Humanitasmirasole@legalmail.it
Dati del rappresentante legale: Ing. Riccardo Bui

Titolo del progetto: Patologia Digitale, Big Data & HPC

- Focus Scientifico: Conversione del patrimonio istopatologico in dati quantitativi riutilizzabili per la predizione diagnostico-prognostica e la medicina computazionale.
- Tecnologie Chiave: Scanner Epredia 3DHISTECH Pannoramic 480, Cluster HPC dedicato con accelerazione GPU.

La digitalizzazione whole-slide dell'archivio istopatologico converte un patrimonio oggi confinato al referto in dato quantitativo e riutilizzabile per la ricerca. Lo scanner Epredia 3DHISTECH Pannoramic 480 abilita una piattaforma trasversale agli ambiti oncologico, ematologico, immunologico, gastroenterologico e cardiopolmonare: annotazione strutturata delle immagini, sviluppo di modelli di intelligenza artificiale per diagnosi, prognosi e predizione di risposta, integrazione con dati clinici e molecolari, costituzione di coorti digitali per studi multicentrici.

Data, 12/08/2026

Il Responsabile del Progetto Il Legale Rappresentante

Si autorizza al trattamento dei dati ai sensi del d.lgs. 196/2003

Il Legale Rappresentante

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

Rendiconto 5 per mille ANNO 2024 Contributo percepito € 1.732.748,66 in data 02/10/2025

Ente della Ricerca Sanitaria Denominazione Ente: IRCCS Istituto Clinico Humanitas Codice fiscale: 10125410158 Sede legale: via Manzoni 56 – 20089 – Rozzano (MI) Indirizzo di posta elettronica dell'ente: direzione.generale@humanitas.it Humanitasmirasole@legalmail.it Dati del rappresentante legale: Ing. Riccardo Bui

Titolo del progetto: Intercellular Communication in the Aging Heart

Data di inizio progetto: 01/01/2025	**Data di fine progetto**: 31/12/2025
Fondi 5 per mille assegnati al progetto: **€ 100.000,00**	**Di cui:** **Quota da sostenere entro l'anno di rendicontazione: € 0,00** **Quota accantonata, da sostenere, per progetti pluriennali (durata massima tre anni): € 100.000,00**

VOCI DI SPESA	**Quota da sostenere entro l'anno di rendicontazione**	**Quota accantonata, da sostenere, per progetti pluriennali (durata massima tre anni)**
Personale di ricerca (borsista, a contratto e di ruolo in quota parte)	0,00	0,00

Apparecchiature (ammortamento, canone di locazione/leasing)	0,00	0,00
Materiale d'uso destinato alla ricerca (per laboratori di ricerca, acquisto farmaci ecc.)	0,00	0,00
Spese di organizzazione (manifestazioni e convegni, viaggi e missioni ecc.)	0,00	0,00
Elaborazione dati	0,00	85.000,00
Spese amministrative	0,00	15.000,00
Altro (N/A)	0,00	0,00
TOTALE	**0,00**	**100.000,00**

Data, 12/08/2026

Il Responsabile del Progetto

Il Legale Rappresentante

Si autorizza al trattamento dei dati ai sensi del d.lgs. 196/2003

Il Legale Rappresentante

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

Rendiconto 5 per mille ANNO 2024
Contributo percepito € 1.732.748,66 in data 02/10/2025

Ente della Ricerca Sanitaria
Denominazione Ente: IRCCS Istituto Clinico Humanitas
Codice fiscale: 10125410158
Sede legale: via Manzoni 56 – 20089 – Rozzano (MI)
Indirizzo di posta elettronica dell'ente:
direzione.generale@humanitas.it
Humanitasmirasole@legalmail.it
Dati del rappresentante legale: Ing. Riccardo Bui

Titolo del progetto: Intercellular Communication in the Aging Heart

Le malattie cardiovascolari rimangono la principale causa di mortalità nelle società occidentali e l'invecchiamento rappresenta il loro più forte fattore di rischio indipendente. L'invecchiamento compromette progressivamente la contrazione e il rilassamento del miocardio, aumentando la suscettibilità all'insufficienza cardiaca. Ciononostante, i meccanismi molecolari responsabili di questo declino rimangono non del tutto compresi, in parte perché la maggior parte degli studi sperimentali e clinici si è concentrata su soggetti giovani o di mezza età.

I nostri studi preliminari mostrano che l'invecchiamento induce un ampio Rimodellamento trascrizionale in tutte le principali popolazioni di cellule cardiache, tra cui cardiomiociti, cellule endoteliali, fibroblasti e cellule immunitarie. Questi cambiamenti alterano le vie metaboliche, contrattili, infiammatorie e fibrotiche e si prevede che interrompano i segnali paracrini che mantengono l'omeostasi miocardica. Ipotizziamo quindi che l'invecchiamento cardiaco sia guidato da cambiamenti cellula-specifici nell'attività degli enhancer, che riprogrammano l'espressione genica e ridefiniscono la comunicazione intercellulare all'interno del miocardio.

Il progetto genererà innanzitutto un atlante dell'invecchiamento cardiaco spazialmente risolto e sesso-specifico, integrando il sequenziamento dell'RNA bulk, la trascrittomica a singola cellula e a singolo nucleo, e la trascrittomica spaziale in topi maschi e femmine di diverse età. Queste analisi ricostruiranno le reti ligando-recettore e identificheranno le interazioni di segnalazione che vengono progressivamente alterate durante l'invecchiamento. Caratterizzeremo poi i programmi di enhancer che controllano questi circuiti di comunicazione attraverso l'analisi dell'accessibilità della cromatina, delle

modificazioni istoniche e delle interazioni enhancer-promotore. Verranno inoltre studiate biopsie cardiache umane di individui di diverse età mediante RNA-seq a singolo nucleo e ATAC-seq, per identificare i meccanismi regolatori conservati tra topo e uomo.

Infine, enhancer selezionati saranno testati funzionalmente mediante editing epigenetico basato su CRISPR in topi anziani e in modelli cardiaci multicellulari umani, inclusi organoidi cardiaci e tessuti cardiaci ingegnerizzati. Questi esperimenti determineranno se la modulazione mirata degli enhancer sia in grado di ripristinare la comunicazione intercellulare fisiologica e migliorare la disfunzione cardiaca associata all'età.

Il progetto genererà dataset trascrittomici, epigenomici, spaziali e multi-omici di grandi dimensioni e complessità. Elaborazione ad alte prestazioni (HPC), accelerazione GPU, archiviazione ad alta capacità e gestione centralizzata dei cluster sono quindi essenziali per l'elaborazione, l'integrazione, la conservazione sicura dei dati e l'analisi riproducibile. L'infrastruttura proposta fornirà una piattaforma computazionale condivisa per identificare i meccanismi causali e i potenziali bersagli terapeutici nell'invecchiamento cardiaco.

Data, 12/08/2026

Il Responsabile del Progetto

Il Legale Rappresentante

Si autorizza al trattamento dei dati ai sensi del d.lgs. 196/2003

Il Legale Rappresentante

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

Rendiconto 5 per mille ANNO 2024
Contributo percepito € 1.732.748,66 in data 02/10/2025

Ente della Ricerca Sanitaria
Denominazione Ente: IRCCS Istituto Clinico Humanitas
Codice fiscale: 10125410158
Sede legale: via Manzoni 56 – 20089 – Rozzano (MI)
Indirizzo di posta elettronica dell'ente:
direzione.generale@humanitas.it
Humanitasmirasole@legalmail.it
Dati del rappresentante legale: Ing. Riccardo Bui

Titolo del progetto: Personalizzazione delle terapie antibiotiche ed antifungine nel paziente complesso mediante approcci combinati di farmacologia clinica e microbiologia

Data di inizio progetto: 01/09/2026	**Data di fine progetto**: 31/08/2029
Fondi 5 per mille assegnati al progetto: **€ 158.797,22**	**Di cui:** **Quota da sostenere entro l'anno di rendicontazione: € 0,00** **Quota accantonata, da sostenere, per progetti pluriennali (durata massima tre anni): € 158.797,22**

VOCI DI SPESA	Quota da sostenere entro l'anno di rendicontazione	Quota accantonata, da sostenere, per progetti pluriennali (durata massima tre anni)
Personale di ricerca (borsista, a contratto e di ruolo in quota parte)	0,00	30.000,00

Apparecchiature (ammortamento, canone di locazione/leasing)	0,00	65.000,00
Materiale d'uso destinato alla ricerca (per laboratori di ricerca, acquisto farmaci ecc.)	0,00	39.977,64
Spese di organizzazione (manifestazioni e convegni, viaggi e missioni ecc.)	0,00	0,00
Elaborazione dati	0,00	0,00
Spese amministrative	0,00	23.819,58
Altro (N/A)	0,00	0,00
TOTALE	**0,00**	**€ 158.797,22**

Data, 12/08/2026

Il Responsabile del Progetto

Il Legale Rappresentante

Si autorizza al trattamento dei dati ai sensi del d.lgs. 196/2003

Il Legale Rappresentante

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

Rendiconto 5 per mille ANNO 2024
Contributo percepito € 1.732.748,66 in data 02/10/2025

Ente della Ricerca Sanitaria
Denominazione Ente: IRCCS Istituto Clinico Humanitas
Codice fiscale: 10125410158
Sede legale: via Manzoni 56 – 20089 – Rozzano (MI)
Indirizzo di posta elettronica dell'ente:
direzione.generale@humanitas.it
Humanitasmirasole@legalmail.it
Dati del rappresentante legale: Ing. Riccardo Bui

Titolo del progetto: Personalizzazione delle terapie antibiotiche ed antifungine nel paziente complesso mediante approcci combinati di farmacologia clinica e microbiologia

Razionale del progetto

Nella pratica clinica quotidiana i farmaci vengono solitamente prescritti utilizzando schemi impostati sulla scorta di informazioni derivate dagli studi registrativi, e gli eventuali aggiustamenti posologici sono spesso attuati in modo empirico. Tuttavia, è esperienza comune che lo stesso farmaco, somministrato alla stessa dose, possa essere efficace nella maggioranza dei soggetti trattati risultando però scarsamente efficace e/o con effetti collaterali, a volte anche gravi, in alcuni pazienti. Di fatto, il notevole aumento di risposte imprevedibili ai farmaci sta diventando un problema sempre più rilevante nella società attuale. Alla luce di quanto sopra detto, trova utile ed efficace un approccio più razionale alla terapia farmacologica, in cui la posologia sia definita tenendo conto di tutte le variabili sopra elencate, delle evidenze scientifiche in continua evoluzione e di test diagnostici specifici in grado di valutare l'esposizione individuale del paziente al singolo farmaco.
Tali concetti hanno validità generale ma possono trovare particolare applicazione in setting clinici specifici, come nel campo delle malattie infettive. Sempre più frequentemente si osserva infatti che le posologie convenzionali di antibiotici e antifungini non sono sufficienti per ottenere valori target di farmacocinetica/farmacodinamica (PK/PD) nei pazienti complessi (critici, obesi, iperfiltranti, ipoalbuminemici, con insufficienza degli organi emuntori, sottoposti a procedure dialitiche ecc), potenzialmente aumentando il rischio di fallimento terapeutico. Per tale motivo, il ruolo del monitoraggio terapeutico (TDM, therapeutic drug monitoring) associato al dato microbiologico puntuale,

sono cruciali per l'ottimizzazione della posologia dei diversi antibiotici e antifungini (si veda elenco sotto).

Tabella 1: Farmaci sottoposti a monitoraggio terapeutico

antibiotici	**anifungini**
Ampicillina	Itraconazolo
Cefepime	Isavuconazolo
Ceftazidime	Posaconazolo
Linezolid	Voriconazolo
Meropenem	
Piperacillina/tazobactam	
Sulbactam	
Vancomicina	
Gentamicina	

Scopo dello studio

Lo scopo di questo studio è di verificare se l'identificazione di approcci terapeutici personalizzati per le terapie antibiotiche ed antifungine basati su dati di TDM e di microbiologia puntuale possano migliorare l'outcome clinico di pazienti complessi rispetto all'utilizzo di posologie convenzionali.
La nostra ipotesi è che in questi pazienti ci possa essere una potenziale esposizione subottimale alle terapie infettive utilizzate alle posologie convenzionali.

Disegno dello Studio

Verranno inclusi pazienti definiti su giudizio clinico come "complessi" presso l'IRCCS Humanitas con diagnosi di infezione batterica o fungina (qualsiasi source of infection) con necessità di terapia per via endovenosa. Questi pazienti verranno sottoposti a TDM dei farmaci antibiotici ed antifungini indicati in Tabella 1 seguendo il seguente schema:

- Esecuzione di prelievo di valle (trough, entro 30 minuti prima della somministrazione del farmaco) e prelievo di picco (Cmax, da eseguire 30 minuti dopo il termine dell'infusione).
- Per farmaci somministrati in infusione continua sarà raccolto un solo campione ematico senza precauzioni particolari riguardanti il tempo di campionamento
- Tutti i prelievi saranno eseguiti in condizioni di steady-state (condizione che si raggiunge ad un tempo corrispondente a 4/5 emivite del farmaco) e ripetuti ad intervalli regolari
- Oltre alla raccolta dei prelievi ematici per la quantificazione delle concentrazioni sistemiche di antibiotici ed antifungini, sarà prevista la raccolta anche di altri matrici biologiche (liquido cefalorachidiano, fluido di rivestimento epiteliale, ecc) in condizioni cliniche particolari per valutare l'esposizione dei farmaci anti-infettivi in distretti critici (polmone, sistema nervoso centrale).

I risultati di TDM ottenuti, associati al dato microbiologico (quando disponibile) verranno utilizzati per la stima della posologia ottimale al fine di raggiungere target PK/PD dettati dalla letteratura corrente.

Ai fini di valutare anche un gruppo di controllo, verranno considerati pazienti definiti su base clinica come “complessi” (si vedano criteri di inclusione) presso l’IRCCS Humanitas con diagnosi di infezione batterica o fungina (qualsiasi source of infection) con necessità di terapia per via endovenosa trattati prima dell’implementazione del monitoraggio terapeutico del farmaco (historical controls).

Criteri di inclusione:

- Diagnosi di infezione batterica o antifungina
- Adulti > 18 anni
- Firma del consenso informato studio specifico
- Definizione della complessità del paziente su base clinica

Quantificazione di antibiotici e antifungini in diverse matrici biologiche

In questo progetto verranno quantificate le concentrazioni plasmatiche (ed eventualmente liquorali e polmonari) di antibiotici e antifungini (descritti in Tabella 1) somministrati per via endovenosa utilizzando metodiche in cromatografia liquida ad elevate prestazioni associate a detector ultravioletto (HPLC-UV). Tali metodiche prevedono la purificazione della matrice plasmatica mediante precipitazione delle proteine plasmatiche e successiva centrifugazione. Il surnatante ottenuto verrà addizionato con uno standard interno; i componenti principali della soluzione ottenuta (antibiotico e relativo standard interno) verranno separati cromatograficamente da altri prodotti presenti (xenobiotici, sostanze endogene) sfruttando la diversa affinità di queste molecole per la colonna cromatografica e le fasi mobili utilizzate. Dopo la separazione cromatografica, la quantificazione verrà eseguita valutando il segnale di emissione nel campo UV ottenuto dai campioni in studio con il segnale di calibratori e controlli processati contestualmente nel corso di ogni analisi. Le concentrazioni di antibiotico ottenute verranno utilizzate per la stima dei principali parametri farmacocinetici che verranno confrontati tra casi e controlli.

La posologia ottimale di farmaco anti-infettivo verrà stimata in ogni paziente mediante modelli farmacologici che tengano in considerazione le caratteristiche del paziente (funzionalità degli organi emuntori, concomitanti patologie, età, ecc), le caratteristiche del farmaco (proprietà chimico-fisiche, capacità di diffusione/penetrazione, ecc) e la sensibilità del patogeno per il dato antibiotico o antifungino (espresso dal valore puntuale di minima concentrazione inibente, MIC).

Data, 12/08/2026

Il Responsabile del Progetto Il Legale Rappresentante

Si autorizza al trattamento dei dati ai sensi del d.lgs. 196/2003

Il Legale Rappresentante

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

Rendiconto 5 per mille ANNO 2024
Contributo percepito € 1.732.748,66 in data 02/10/2025

Ente della Ricerca Sanitaria
Denominazione Ente: IRCCS Istituto Clinico Humanitas
Codice fiscale: 10125410158
Sede legale: via Manzoni 56 – 20089 – Rozzano (MI)
Indirizzo di posta elettronica dell'ente:
direzione.generale@humanitas.it
Humanitasmirasole@legalmail.it
Dati del rappresentante legale: Ing. Riccardo Bui

Titolo del progetto: Causal Microbial Programs Driving Disease Progression and Relapse: From Functional Gut States to Clinical Action

Data di inizio progetto: 01/09/2026	**Data di fine progetto**: 31/08/2029
Fondi 5 per mille assegnati al progetto: **€ 360.000,00**	**Di cui:** **Quota da sostenere entro l'anno di rendicontazione: € 0,00** **Quota accantonata, da sostenere, per progetti pluriennali (durata massima tre anni): € 360.000,00**

VOCI DI SPESA	**Quota da sostenere entro l'anno di rendicontazione**	**Quota accantonata, da sostenere, per progetti pluriennali (durata massima tre anni)**
Personale di ricerca (borsista, a contratto e di ruolo in quota parte)	0,00	150.000,00

Apparecchiature (ammortamento, canone di locazione/leasing)	0,00	120.000,00
Materiale d'uso destinato alla ricerca (per laboratori di ricerca, acquisto farmaci ecc.)	0,00	36.000,00
Spese di organizzazione (manifestazioni e convegni, viaggi e missioni ecc.)	0,00	0,00
Elaborazione dati	0,00	0,00
Spese amministrative	0,00	54.000,00
Altro (N/A)	0,00	0,00
TOTALE	**0,00**	**360.000,00**

Data, 12/08/2026

Il Responsabile del Progetto

Il Legale Rappresentante

Si autorizza al trattamento dei dati ai sensi del d.lgs. 196/2003

Il Legale Rappresentante

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

Rendiconto 5 per mille ANNO 2024
Contributo percepito € 1.732.748,66 in data 02/10/2025

Ente della Ricerca Sanitaria
Denominazione Ente: IRCCS Istituto Clinico Humanitas
Codice fiscale: 10125410158
Sede legale: via Manzoni 56 – 20089 – Rozzano (MI)
Indirizzo di posta elettronica dell'ente:
direzione.generale@humanitas.it
Humanitasmirasole@legalmail.it
Dati del rappresentante legale: Ing. Riccardo Bui

Titolo del progetto: Causal Microbial Programs Driving Disease Progression and Relapse: From Functional Gut States to Clinical Action

Introduzione e Razionale Scientifico

Nell'ultimo decennio, i principali sforzi nella ricerca sul microbioma hanno mappato le alterazioni microbiche associate alle malattie nelle patologie gastrointestinali, ma pochi di questi segnali si sono tradotti in strumenti clinicamente utili. La maggior parte delle firme basate sul microbiota rimane trasversale, tassonomica e basata su associazioni, con una limitata specificità diagnostica e una scarsa riproducibilità tra coorti, stadi della malattia o contesti terapeutici 1,2.

Questo divario riflette un limite strutturale: gli approcci attuali catturano *cosa* cambia nel microbiota, ma non *come* tali cambiamenti influenzino meccanisticamente i tessuti dell'ospite, né se questi segnali possano funzionare come marcatori biologici stabili per il processo decisionale clinico.

Nelle malattie infiammatorie croniche intestinali (MICI / IBD), il principale bisogno insoddisfatto risiede nel prevedere la risposta al trattamento e le traiettorie di recidiva durante la terapia con farmaci biologici. Circa il 30–50% dei pazienti in apparente remissione va incontro a recidiva nonostante la soppressione dell'infiammazione, indicando che gli stati funzionali microbici possono persistere oltre l'attività clinica manifesta e modellare fenotipi di remissione proni alla recidiva 3,4.

Nel cancro del colon-retto (CRC), le alterazioni microbiche mostrano un comportamento correlato allo stadio della patologia e influenzano l'insorgenza, la progressione e la

disseminazione metastatica del tumore attraverso vie genotossiche, metaboliche e immunitarie. Analisi multi-coorte mostrano che i modelli basati sul microbioma raggiungono valori di AUC prossimi a 0,8 per la diagnosi precoce e la stratificazione del rischio 5,6; tuttavia, i biomarcatori proposti difettano di robustezza e interpretabilità funzionale, limitandone l'applicazione nella sorveglianza longitudinale e nella stratificazione pre-operatoria.

In entrambe le patologie, evidenze convergenti indicano l'importanza di effettori microbici causali piuttosto che di variazioni tassonomiche statiche. Sempre più spesso, tali effettori non sono metaboliti o tossine liberamente diffusibili, ma sono incapsulati all'interno di vescicole extracellulari batteriche (BEV) — nanoparticelle derivate da membrane, biologicamente stabili e bersaglio-specifiche, che trasportano proteine, lipidi, acidi nucleici e molecole immunomodulanti 7–9. Le BEV mantengono informazioni sull'origine microbica e sullo stato funzionale, possono attraversare le barriere mucose, interagire con le vie epiteliali e immunitarie e sono rilevabili in diversi compartimenti tra cui feci, sangue e tessuti, rendendole intrinsecamente compatibili con lo sviluppo di biomarcatori clinici.

Lavori preliminari mostrano che le attività funzionali microbiche possono esercitare effetti causali sui tessuti intestinali ed extra-intestinali. Nel CRC, abbiamo dimostrato che i segnali microbici condizionano l'integrità epiteliale e modellano una nicchia pre-metastatica permissiva per l'insediamento di cellule tumorali o, al contrario, esercitano effetti protettivi contro lo sviluppo del tumore 10,11. In parallelo, i nostri studi sulle MICI indicano che la modulazione di specifici commensali influenza le risposte immunitarie e di barriera associate alle traiettorie della malattia 12,13. Andando oltre l'intestino, dati recenti rivelano un controllo microbico sulle barriere vascolari, stabilendo un quadro concettuale e meccanistico per la modulazione sistemica delle patologie guidata dal microbiota 14–16.

Su queste basi, il presente progetto mira a stabilire una piattaforma di microbiologia traslazionale basata su meccanismi, focalizzata sull'identificazione e la validazione di stati funzionali microbici causali e sulla loro traduzione in firme di biomarcatori stabili rilevanti per MICI e CRC. Integrando coorti di pazienti, saggi funzionali microbici controllati, biologia delle BEV e test mucosali *ex vivo*, il progetto promuove un modello che passa dall'associazione alla causalità e alla traslazione, colmando un divario critico e attualmente insoddisfatto nella ricerca sul microbiota.

Obiettivi

L'obiettivo generale di questo progetto è stabilire una piattaforma di microbiologia traslazionale guidata dalla scoperta che identifichi, validi meccanisticamente e traduca clinicamente gli stati funzionali microbici che modellano le traiettorie di malattia nelle malattie infiammatorie croniche intestinali (MICI) e nel cancro del colon-retto (CRC). La piattaforma è organizzata in tre obiettivi strettamente connessi, corrispondenti a tre Obiettivi Specifici (Aims).

- **Aim 1 – Definire gli stati funzionali microbici rilevanti per la malattia nelle MICI e nel CRC**

  Il primo obiettivo è identificare gli stati funzionali di origine microbica associati a traiettorie clinicamente rilevanti nelle MICI e nel CRC. Piuttosto che descrivere le variazioni tassonomiche, il progetto si concentra su prodotti microbici funzionalmente coerenti, con un'attenzione particolare alle BEV come vettori integrativi dell'attività microbica. Nelle MICI, gli stati saranno definiti in relazione

alla risposta al trattamento e alla stabilità della remissione. Nel CRC, gli stati saranno risolti attraverso le traiettorie di rischio e progressione. Questo obiettivo fornisce un insieme limitato e biologicamente interpretabile di stati candidati, selezionati prioritariamente per i test meccanistici.

- **Aim 2 – Stabilire la causalità tra i prodotti microbici e i programmi dei tessuti intestinali umani**

  Il secondo obiettivo è determinare se gli stati funzionali microbici identificati nell'Aim 1 agiscano come fattori causali delle risposte dei tessuti dell'ospite. Sistemi sperimentali paziente-specifici esporranno biopsie ed espianti intestinali alle BEV e a surnatanti microbici condizionati per quantificare gli effetti sull'integrità della barriera epiteliale, sulla programmazione immunitaria e sulle vie di stress-riparazione tissutale. Questo obiettivo fornisce il quadro meccanistico che collega l'attività microbica a stati dell'ospite permissivi o risolutivi rispetto alla patologia.

- **Aim 3 – Tradurre gli stati microbici causalmente validati in biomarcatori clinicamente utilizzabili**

  Il terzo obiettivo è convertire le interazioni microbo-ospite causalmente validate in biomarcatori stabili e clinicamente applicabili. Le firme associate alle BEV hanno la priorità grazie alla loro interpretabilità funzionale e alla compatibilità con il rilevamento multi-compartimentale (feci, sangue, tessuto). Nelle MICI, questi biomarcatori mirano a supportare il monitoraggio longitudinale della stabilità della remissione e del rischio di recidiva. Nel CRC, mirano a perfezionare la stratificazione del rischio e della progressione in linea con il processo decisionale clinico. Questo obiettivo stabilisce il risultato traslazionale della piattaforma.

Metodologia
Coorti di Pazienti, Fenotipizzazione e Tempistiche

Il progetto include due bracci clinici coordinati: colite ulcerosa e cancro del colon-retto. Entrambi i bracci forniscono feci, sangue e tessuto intestinale accoppiati per ciascun paziente, consentendo l'interrogazione meccanistica dell'asse microbiota-mucosa.

- **Il braccio MICI** comprende 80 pazienti adulti con colite ulcerosa alla prima esposizione alla terapia anti-TNF, arruolati nell'ambito del progetto Humanitas 5×1000 “GYPsi – Studio integrato dell'asse intestino-cervello nelle malattie infiammatorie croniche intestinali” (Armuzzi, PI; Carloni, Co-PI). Il campionamento viene effettuato in due momenti definiti: **T0**, corrispondente alla malattia attiva prima della terapia di induzione, e **T2**, corrispondente alla rivalutazione post-induzione. In entrambi i punti temporali vengono raccolti biopsie intestinali, feci e sangue, consentendo analisi integrate tra i compartimenti intestinali, sistemici e gut-brain. Parametri clinici, biochimici e di rilevanza neuro-infiammatoria — tra cui la calprotectina fecale, gli indici sintomatici e l'escalation terapeutica — sono utilizzati per classificare la risposta al trattamento e il rischio di recidiva, con particolare attenzione alla remissione prona a recidiva, una condizione in cui il miglioramento biochimico non è accompagnato da una completa normalizzazione mucosale o microbica.
- **Il braccio CRC** include circa 30 pazienti non pretrattati arruolati nell'ambito dell'AIRC My First Grant “ARGOS-CRC” con nuova diagnosi di carcinoma colorettale. Feci e sangue vengono raccolti al momento della diagnosi, mentre il tessuto intestinale viene prelevato durante la resezione chirurgica o la biopsia

diagnostica. Per i casi chirurgici, la mucosa adiacente non tumorale viene campionata come interfaccia epiteliale primaria per i test funzionali (tipicamente a 3–5 cm dal margine tumorale), mentre il tessuto tumorale è incluso come comparatore patologico quando disponibile. La localizzazione del tumore (colon vs retto) e la stadiazione TNM sono documentate per contestualizzare i prodotti funzionali microbici lungo le traiettorie di progressione del CRC.

Impatto Atteso

L'impatto di questo progetto va oltre la generazione di singoli biomarcatori e affronta una limitazione strutturale nella ricerca sul microbiota e nella pratica clinica: l'assenza di un quadro in grado di decifrare gli stati funzionali microbici e collegarli a endpoint clinicamente rilevanti.

- **Impatto scientifico:** Il progetto fornisce un modello basato su meccanismi per interpretare i segnali associati al microbiota attraverso risultati causali e funzionalmente fondati, piuttosto che correlazioni tassonomiche statiche. Questo cambio di paradigma consente di definire i biomarcatori microbici come indicatori di processi biologici, supportando firme più robuste e interpretabili per le malattie infiammatorie croniche intestinali e il cancro del colon-retto.
- **Impatto clinico:** La piattaforma supporta la diagnosi precoce, la stratificazione del rischio e il monitoraggio longitudinale utilizzando segnali stabili, meccanisticamente interpretabili e resilienti alle perturbazioni terapeutiche. Queste firme sono posizionate per integrare le attuali strategie diagnostiche e ridurre il ricorso a procedure invasive, con implicazioni dirette per la gestione del paziente in Gastroenterologia.
- **Impatto istituzionale e traslazionale:** Integrando coorti di pazienti, validazione sperimentale e pipeline analitiche all'interno di un'unica piattaforma traslazionale, il progetto internalizza competenze che sono tipicamente frammentate o esternalizzate. Questo consolidamento accelera i tempi di risposta, riduce la dipendenza da strutture esterne e rafforza la competitività per finanziamenti esterni e studi collaborativi, incluse le iniziative promosse da ricercatori o in partnership con l'industria.
- **Impatto a lungo termine:** Nel lungo periodo, la piattaforma consentirà approcci personalizzati alla gestione delle patologie guidati dal microbiota e supporterà l'affermazione di una microbiologia traslazionale basata sui meccanismi. Collegando i dati dei pazienti alla scoperta sperimentale e, di ritorno, all'applicazione clinica, il progetto genererà un valore duraturo oltre la sua durata naturale, posizionando Humanitas all'avanguardia nella traslazione clinica della ricerca sul microbiota nelle MICI e nel CRC.

Reference

1. Mallick, H. *et al.* Multivariable association discovery in population-scale meta-omics studies. *PLoS Comput Biol* 17, (2021).
2. Sinha, R. *et al.* Assessment of variation in microbial community amplicon sequencing by the Microbiome Quality Control (MBQC) project consortium. *Nat Biotechnol* 35, 1077–1086 (2017).
3. Halfvarson, J. *et al.* Dynamics of the human gut microbiome in inflammatory bowel disease. *Nat Microbiol* 2, (2017).
4. lloyd-Price, J. *et al.* Multi-omics of the gut microbial ecosystem in inflammatory bowel diseases. *Janet K. Jansson* 15, 22.
5. Sepich-Poore, G. D. *et al.* The microbiome and human cancer. *Science* 371, (2021).
6. Wirbel, J. *et al.* Meta-analysis of fecal metagenomes reveals global microbial signatures that are specific for colorectal cancer. *Nat Med* 25, 679–689 (2019).
7. Schwechheimer, C. & Kuehn, M. J. Outer-membrane vesicles from Gram-negative bacteria: biogenesis and functions. *Nature Reviews Microbiology 2015 13:10* 13, 605–619 (2015).

8. Tulkens, J., De Wever, O. & Hendrix, A. Analyzing bacterial extracellular vesicles in human body fluids by orthogonal biophysical separation and biochemical characterization. *Nat Protoc* 15, 40–67 (2020).
9. Kaparakis-Liaskos, M. & Ferrero, R. L. Immune modulation by bacterial outer membrane vesicles. *Nat Rev Immunol* 15, 375–387 (2015).
10. Zagato, E. *et al.* Endogenous murine microbiota member Faecalibaculum rodentium and its human homologue protect from intestinal tumour growth. *Nat Microbiol* 5, 511–524 (2020).
11. Bertocchi, A. *et al.* Gut vascular barrier impairment leads to intestinal bacteria dissemination and colorectal cancer metastasis to liver. *Cancer Cell* 39, 708-724.e11 (2021).
12. Burrello, C. *et al.* Therapeutic faecal microbiota transplantation controls intestinal inflammation through IL10 secretion by immune cells. *Nat Commun* 9, (2019).
13. Mouries, J. *et al.* Microbiota-driven gut vascular barrier disruption is a prerequisite for non-alcoholic steatohepatitis development. *J Hepatol* 71, 1216–1228 (2019).
14. Carloni, S. & Rescigno, M. The gut-brain vascular axis in neuroinflammation. *Semin Immunol* 69, (2023).
15. Carloni, S. & Rescigno, M. Unveiling the gut-brain axis: structural and functional analogies between the gut and the choroid plexus vascular and immune barriers. *Semin Immunopathol* 44, 869–882 (2022).
16. Carloni, S. *et al.* Identification of a choroid plexus vascular barrier closing during intestinal inflammation. *Science* 374, 439–448 (2021).

Data, 12/08/2026

Il Responsabile del Progetto

Il Legale Rappresentante

Si autorizza al trattamento dei dati ai sensi del d.lgs. 196/2003

Il Legale Rappresentante

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

Rendiconto 5 per mille ANNO 2024
Contributo percepito € 1.732.748,66 in data 02/10/2025

Ente della Ricerca Sanitaria
Denominazione Ente: IRCCS Istituto Clinico Humanitas
Codice fiscale: 10125410158
Sede legale: via Manzoni 56 – 20089 – Rozzano (MI)
Indirizzo di posta elettronica dell'ente:
direzione.generale@humanitas.it
Humanitasmirasole@legalmail.it
Dati del rappresentante legale: Ing. Riccardo Bui

Titolo del progetto: ALMA-AI: an AI-driven tumor-agnostic multimodal plasma platform for dynamic monitoring of circulating tumor DNA analysis

Data di inizio progetto: 01/09/2026	**Data di fine progetto**: 31/08/2026
Fondi 5 per mille assegnati al progetto: **€ 92.700,04**	**Di cui:** **Quota da sostenere entro l'anno di rendicontazione: € 0,00** **Quota accantonata, da sostenere, per progetti pluriennali (durata massima tre anni): € 92.700,04**

VOCI DI SPESA	**Quota da sostenere entro l'anno di rendicontazione**	**Quota accantonata, da sostenere, per progetti pluriennali (durata massima tre anni)**
Personale di ricerca (borsista, a contratto e di ruolo in quota parte)	0,00	0,00

Apparecchiature (ammortamento, canone di locazione/leasing)	0,00	0,00
Materiale d'uso destinato alla ricerca (per laboratori di ricerca, acquisto farmaci ecc.)	0,00	78.795,03
Spese di organizzazione (manifestazioni e convegni, viaggi e missioni ecc.)	0,00	0,00
Elaborazione dati	0,00	0,00
Spese amministrative	0,00	13.905,01
Altro (N/A)	0,00	0,00
TOTALE	**0,00**	**92.700,04**

Data, 12/08/2026

Il Responsabile del Progetto

Il Legale Rappresentante

Si autorizza al trattamento dei dati ai sensi del d.lgs. 196/2003

Il Legale Rappresentante

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

Rendiconto 5 per mille ANNO 2024
Contributo percepito € 1.732.748,66 in data 02/10/2025

Ente della Ricerca Sanitaria
Denominazione Ente: IRCCS Istituto Clinico Humanitas
Codice fiscale: 10125410158
Sede legale: via Manzoni 56 – 20089 – Rozzano (MI)
Indirizzo di posta elettronica dell'ente:
direzione.generale@humanitas.it
Humanitasmirasole@legalmail.it
Dati del rappresentante legale: Ing. Riccardo Bui

Titolo del progetto: ALMA-AI: an AI-driven tumor-agnostic multimodal plasma platform for dynamic monitoring of circulating tumor DNA analysis

Stato dell'Arte

L'analisi del DNA tumorale circolante (ctDNA) si è affermata come un approccio minimamente invasivo che consente il monitoraggio longitudinale della dinamica tumorale e può servire da marcatore surrogato della risposta terapeutica, sia nella malattia avanzata sia in fase precoce. La maggior parte dei saggi attualmente disponibili non riesce a cogliere la piena complessità del ctDNA, in quanto esamina tipicamente un solo livello di informazione biologica alla volta (es. frazione tumorale, TF; alterazioni somatiche del numero di copie, SCNA; varianti a singolo nucleotide, SNV; rapporto di lunghezza dei frammenti, FLR; regioni differentemente meitlate, DMR), traducendosi in una sensibilità subottimale, in particolare nei tumori a basso rilascio (*low-shedding*). Molti di questi approcci sono basati sulle caratteristiche del tumore primario (*tumor-informed*) o specifici per tipo di tumore (*tumor-specific*), il che ne limita la scalabilità e la più ampia applicabilità clinica.

Raggiungere una sensibilità sufficiente per intercettare in modo affidabile eventi clinicamente rilevanti, come la malattia minima residua (MRD), la recidiva molecolare precoce (EMR) e la risposta molecolare (MR), rimane una sfida principale per gli attuali approcci di biopsia liquida (LB). Per superare questi limiti, vi è una chiara necessità di strategie di LB multimodali in grado di interrogare e integrare simultaneamente più livelli della biologia del ctDNA. Lo sviluppo di tali flussi di lavoro analitici integrati è fondamentale per consentire una rilevazione robusta di questi eventi e per sostenere un'efficace implementazione clinica dei saggi basati sul ctDNA.

Sulla scorta di questo bisogno di una maggiore sensibilità e di un'integrazione multimodale, sta emergendo anche un importante cambio di paradigma concettuale: gli endpoint clinici come MRD, EMR e MR vengono sempre più intesi come manifestazioni di processi biologici di base condivisi — ovvero il carico tumorale e le sue variazioni dinamiche — piuttosto che come fenomeni specifici per un singolo tipo di tumore. Considerare questi endpoint attraverso una prospettiva "agnostica rispetto al tumore" (*tumor-agnostic*) consente lo sviluppo di modelli analitici unificati applicabili a diversi tipi di cancro e contesti terapeutici. Nel loro insieme, questi avanzamenti aprono la strada alla transizione da saggi monoparametrici e tumore-specifici verso approcci per l'analisi del ctDNA integrati, multimodali e pan-cancro, aumentando in ultima analisi sia la sensibilità sia l'utilità clinica.

Il progetto **ALMA-AI** affronta due domande di ricerca chiave:

1. Se l'integrazione guidata dall'intelligenza artificiale (IA) di molteplici caratteristiche del ctDNA possa migliorare la rilevazione e il monitoraggio di MRD, EMR e MR in diversi tipi di tumore;
2. Se la profilazione multimodale e longitudinale del ctDNA possa ricostruire le dinamiche evolutive del tumore e identificare i subcloni di resistenza emergenti durante il percorso del paziente.

- **L'obiettivo primario** è sviluppare il *Tumor Load Score* (TLS), una metrica integrata che combina frazione tumorale (TF), rapporto di lunghezza dei frammenti (FLR) e regioni differentemente meitlate (DMR), con lo scopo di aumentare la sensibilità e la specificità nella rilevazione della MRD, anticipare l'EMR e monitorare dinamicamente la MR.
- **L'obiettivo secondario** è stabilire il *Genomic Dynamic Score* (GDS), che integra alterazioni somatiche del numero di copie (SCNA), varianti a singolo nucleotide (SNV) e DMR per tracciare l'evoluzione clonale nel tempo, identificare i subcloni resistenti emergenti e modellare quantitativamente la dinamica tumorale all'interno di un framework longitudinale e multimodale.

Disegno della Ricerca, Metodologia Generale e Metodi

Il progetto si avvale di una coorte ben caratterizzata di 1.687 campioni di plasma, tra cui 1.257 campioni raccolti retrospettivamente e 430 generati prospetticamente nell'ambito della proposta. Tutti i campioni vengono analizzati in modo uniforme con la piattaforma **ALMA-seq** (*Agnostic Liquid biopsy Multimodal Advancement*), un flusso di lavoro di biopsia liquida accademico, tumore-agnostico e multimodale sviluppato internamente, in grado di esaminare più livelli di ctDNA da un singolo campione di plasma.

Il dataset comprende sette tumori solidi:

- Carcinoma ovarico sieroso di alto grado (HGSOC)
- Mesotelioma pleurico
- Carcinoma polmonare non a piccole cellule (NSCLC)
- Tumore della mammella HR+/HER2- (BC)
- Tumori del distretto testa-collo (H&N)
- Tumori del tratto gastrointestinale superiore (uGI)
- Carcinoma del colon-retto metastatico (mCRC)

Il dataset copre tempistiche cliniche longitudinali chiave (baseline, MRD, MR ed EMR) ed è supportato da dettagliate annotazioni cliniche e tempi di follow-up, consentendo una definizione precisa degli endpoint.

Il progetto si struttura in due fasi:

- **a) Fase di Training:** Un totale di 936 campioni retrospettivi viene utilizzato per lo sviluppo dei modelli di IA. Il TLS viene addestrato utilizzando l'algoritmo *gradient boosting* (es. XGBoost) all'interno di un framework di validazione crociata nidificata a livello di paziente (*nested patient-level cross-validation*), per garantire la robustezza ed evitare la fuga di informazioni (*information leakage*). Le prestazioni vengono confrontate con quelle di modelli monoparametrici e di approcci multivariabili più semplici. In parallelo, il GDS viene sviluppato utilizzando strategie probabilistiche — tra cui clustering gerarchico bayesiano, modelli di mistura di processi di Dirichlet e modelli nascosti di Markov (HMM) — per inferire l'architettura sub-clonale e le dinamiche temporali. L'interpretabilità del modello è garantita tramite approcci di *Explainable AI* (es. valori SHAP), fornendo insight a livello di singola caratteristica e specifici per paziente.
- **b) Fase di Validazione:** Le prestazioni del modello vengono valutate in una coorte indipendente ($n=751$), che comprende un set di controllo predefinito ($n=321$) e circa 430 campioni raccolti prospetticamente. Le performance vengono analizzate in termini di sensibilità, specificità, metriche di precisione-richiamo (*precision-recall*), F1-score, calibrazione e analisi ROC. Elemento fondamentale: i segnali precoci di ctDNA non vengono considerati falsi positivi a priori, ma vengono validati longitudinalmente rispetto agli esiti clinici successivi, garantendo che la rilevazione di MRD, EMR e MR rifletta un'attività di malattia biologicamente significativa.

L'elaborazione di laboratorio (*wet-lab*) segue il flusso di lavoro standardizzato ALMA-Seq precedentemente stabilito.

Impatto Atteso

ALMA-AI è progettato per stabilire il prototipo di una piattaforma di biopsia liquida totalmente accademica e tumore-agnostica per il monitoraggio della malattia basato su ctDNA. Integrando molteplici caratteristiche molecolari all'interno di un framework guidato dall'IA, la piattaforma mira ad aumentare la sensibilità nella rilevazione della MRD, ad anticipare l'EMR e a monitorare dinamicamente la MR in diversi contesti clinici.

In quanto prototipo per la "prova di concetto" (*proof-of-concept*), la piattaforma non è destinata all'uso clinico immediato, ma a generare prove solide a supporto della sua potenziale utilità. Si prevede che i risultati forniranno una solida razionale per la progettazione di studi clinici prospettici guidati da biomarcatori — potenziale guida di Humanitas — volti a validare l'utilità clinica dell'analisi multimodale del ctDNA e a definirne il ruolo nell'orientare le decisioni terapeutiche, adattare la terapia e perfezionare la stratificazione dei pazienti.

In linea con la letteratura emergente, tali studi potrebbero valutare se la rilevazione di MRD, EMR e MR tramite biopsia liquida offra vantaggi rispetto alle valutazioni radiografiche o biochimiche convenzionali nel migliorare gli esiti per i pazienti.

Oltre alle applicazioni traslazionali immediate, ALMA-AI contribuirà a una caratterizzazione più coerente e precoce delle dinamiche tumorali, con implicazioni dirette

per la stratificazione del rischio e le decisioni cliniche. In parallelo, il progetto genererà dataset multimodali standardizzati e di alta qualità all'interno di un modello analitico riproducibile, supportando futuri studi di validazione e sforzi di ricerca collaborativi.

Nel complesso, il progetto ALMA-AI riflette la continua evoluzione della ricerca sulla biopsia liquida verso approcci integrati, longitudinali e tumore-agnostici, gettando al contempo basi concrete per futuri studi clinici volti a definire l'utilità clinica della LB nell'ottimizzare la terapia e migliorare i risultati per i pazienti.

Nell’ambito della campagna 5x1000 2024 verrà supportata la fase prima fase di training del progetto. Lo stesso continuerà nell’ambito della campagna 5x1000 2025 che supporterà la fase seconda fase di validazione.

Data, 12/08/2026

Il Responsabile del Progetto

Il Legale Rappresentante

Si autorizza al trattamento dei dati ai sensi del d.lgs. 196/2003

Il Legale Rappresentante