



**UNIVERSITÀ  
DI TORINO**

UNIVERSITA' DEGLI STUDI DI TORINO

DIPARTIMENTO DI SCIENZE MEDICHE

**DOTTORATO DI RICERCA IN SCIENZE BIOMEDICHE ED ONCOLOGIA**

XXXVI° CICLO

TITOLO DELLA TESI:

**PROFILO MORFO-MOLECOLARE ED IMMUNOBIOLOGICO DEL COLANGIOCARCINOMA**

-

**SIMILITUDINI E DIFFERENZE CON LA RISPOSTA IMMUNITARIA NELLE COLANGIOPATIE IMMUNOMEDIATE**

TESI PRESENTATA DA: Dr. *Alessandro* GAMBELLA

TUTOR: Prof. ssa *Paola* CASSONI

COORDINATORE DEL DOTTORATO: Prof. *Andrea* GRAZIANI

ANNI ACCDEMICI: 2020-2024

SETTORE SCIENTIFICO-DISCIPLINARE DI AFFERENZA: MED/08 – ANATOMIA PATOLOGICA

(Cod. GSD: 06/MEDS-04; Cod. SSD: MEDS-04/A)



## INDICE

|   |           |
|---|-----------|
| Abstract  | 1         |
| <b>Capitolo 1. Introduzione</b>   | <b>2</b>  |
| <b>Sezione 1.1:</b> Dati epidemiologici   | 3         |
| <b>Sezione 1.2:</b> Fattori di rischio e profilo molecolare   | 5         |
| <b>Sezione 1.3:</b> Microambiente immunitario peritumorale e confronto con colangiopatie non-neoplastiche               | 7         |
| <b>Sezione 1.4:</b> Linee terapeutiche disponibili, immunoterapia, e trial clinici in corso                             | 11        |
| <b>Sezione 1.5:</b> Scopo e aree di interesse dello studio presentato   | 14        |
| <b>Capitolo 2. Materiali e Metodi</b>   | <b>15</b> |
| <b>Sezione 2.1:</b> Reclutamento pazienti e raccolta dati clinico-patologici  | 15        |
| <b>Sezione 2.2:</b> Indagini istopatologiche “tradizionali”   | 16        |
| <b>Sezione 2.3:</b> Indagini di “Next-Generation Pathology”   | 19        |
| <b>Sezione 2.4:</b> Analisi statistiche   | 20        |
| <b>Capitolo 3. Risultati</b>  | <b>23</b> |
| <b>Sezione 3.1:</b> Panorama genomico della nostra coorte di CC   | 23        |
| <b>Sezione 3.2:</b> Espressione di multipli checkpoint immunitari nei TILs e di Galectina-9 nelle cellule tumorali      | 26        |
| <b>Sezione 3.3:</b> Rare correlazioni sono emerse emergono tra il profilo molecolare e proteomico/immunoistochimico     | 30        |
| <b>Sezione 3.4:</b> Galectina-9 come fattore di rischio indipendente per OS e RFS                                       | 31        |
| <b>Sezione 3.5:</b> L’espressione della Galectina-9 identifica una nicchia di CC caratterizzati da alti livelli di TDO2 | 33        |
| <b>Capitolo 4. Discussione</b>  | <b>35</b> |
| <b>Capitolo 5. Limitazioni e Prospettive Future</b>   | <b>37</b> |
| <b>Capitolo 6. Conclusione</b>  | <b>38</b> |
| <b>Capitolo 7. Bibliografia</b>   | <b>39</b> |

## Abstract

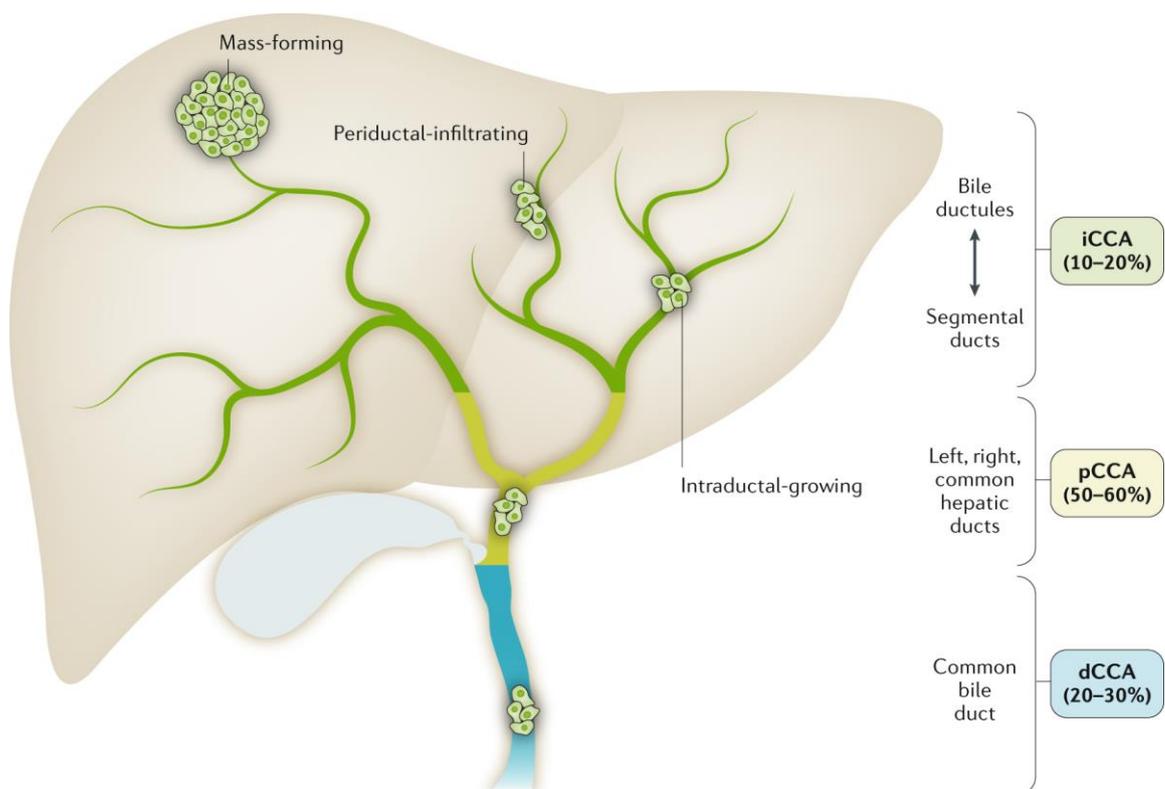
*Introduzione e Obiettivi:* I colangiocarcinomi (CC) sono tumori aggressivi che originano dai colangiociti, caratterizzati da opzioni terapeutiche limitate e risultati insoddisfacenti negli studi clinici di immunoterapia. Questo contrasta con la quasi completa distruzione immuno-mediata dei colangiociti osservata in diverse colangiopatie necro-infiammatorie croniche. Il nostro studio ha analizzato il microambiente immunitario dei CC, focalizzandosi sui meccanismi di espressione proteica e dell'mRNA dei colangiociti di molecole immunologicamente attive e sul danno immuno-mediato, al fine di identificare possibili ragioni per i fallimenti dell'immunoterapia e opportunità di successo.

*Approccio e Risultati:* Demografia, presentazione chirurgica, patologia, profilo mutazionale, instabilità dei microsatelliti, e biomarcatori regolatori immunitari e di inibitori dei checkpoint sono stati analizzati in questo studio monocentrico su 64 campioni di CC extraepatici e 49 intraepatici chirurgicamente resecati. L'espressione variabile di MHCII nelle cellule tumorali è stata osservata nel 33,0% dei casi ed è risultata correlata a: (1) un aumento della densità di linfociti infiltranti il tumore esprimenti LAG3 ( $p=0,003$ ), PD-1 ( $p=0,012$ ) e MHCII ( $p<0,001$ ); (2) mutazione del gene WRN ( $p=0,034$ ); (3) una peggiore sopravvivenza globale dei pazienti nell'analisi univariata (HR: 2,382, 95% CI: 1,413-4,015). Un'elevata espressione proteica della galectina-9 nelle cellule tumorali (Gal-9-TCs-High) è stata associata a una migliore sopravvivenza globale dei pazienti nell'analisi multivariata (HR: 0,325, 95% CI: 0,124-0,854). Gal-9-TCs-High è risultata correlata a una ridotta espressione della proteina TDO2 ( $p<0,001$ ) e dell'mRNA ( $p=0,034$ ), suggerendo un meccanismo di fuga immunitaria del CC e un potenziale target per protocolli di immunoterapia basati sul catabolismo del triptofano.

*Conclusioni:* I meccanismi che regolano l'immunogenicità dei colangiociti nei CC hanno mostrato alcune osservazioni paradossali rispetto al danno immuno-mediato non neoplastico, fornendo spunti per possibili strade verso immunoterapie di maggior successo.

## Capitolo 1. Introduzione

Il colangiocarcinoma (CC) rappresenta un gruppo aggressivo di tumori maligni delle vie biliari con prognosi infausta, incidenza in crescita, e alta mortalità<sup>1,2</sup>. In base alla localizzazione anatomica, al profilo mutazionale, e alla presentazione clinica, i CC si classificano in intraepatici (iCC, 10-20% dei casi) ed extraepatici [eCC, ulteriormente suddivisi in peri-ilari (50-60% dei casi) e distali (20-30% dei casi)] (**Figura 1**)<sup>3,4</sup>.



**Figura 1. Classificazione del colangiocarcinoma sulla base anatomica e relativa frequenza**

(da: Banales JM et al. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol.* 2020 Sep;17(9):557-588)<sup>4</sup>.

Il trattamento attuale per i pazienti con CC include l'escissione chirurgica seguita da chemioterapia e radioterapia adiuvanti, ma i tassi di recidiva sono alti (fino al 60%). Quasi il 70% dei pazienti viene diagnosticato in stadi avanzati e non operabili, e viene trattato con regimi basati su chemio- e radioterapia, che raggiungono una sopravvivenza globale mediana (OS) di 11,7 mesi e una sopravvivenza libera da progressione di malattia mediana (PFS) di 8,0 mesi<sup>4-6</sup>.

### **Sezione 1.1: Dati epidemiologici**

I dati epidemiologici sul CC evidenziano differenze significative in base alla localizzazione anatomica. Sebbene la resezione chirurgica sia il trattamento curativo principale per entrambe le varianti principali del CC – iCC ed eCC – studi hanno mostrato tendenze epidemiologiche divergenti a livello globale. Nei paesi occidentali, la mortalità da iCC è in costante aumento, superando quella da eCC, e ciò riflette fattori di rischio specifici, ma anche verosimili errori di classificazione<sup>1,3,7-9</sup>.

Secondo i dati più recenti dell'Organizzazione Mondiale della Sanità (OMS), i tassi di mortalità standardizzati per età da iCC sono generalmente più elevati rispetto a quelli da eCC, ma gli uomini presentano tassi più alti rispetto alle donne indipendentemente dal sottotipo. Negli ultimi dieci anni, tutti i paesi occidentali hanno registrato un aumento della mortalità da iCC per entrambi i sessi. Ad esempio, nel 2018, i tassi di mortalità standardizzati per età erano maggiori per iCC rispetto a eCC in quasi tutti i paesi europei, tranne che in Ungheria e, limitatamente alle donne, in Svezia. Nello stesso anno, paesi come Irlanda, Portogallo, Spagna, Australia, Canada, Regno Unito e Belgio hanno riportato tassi di mortalità superiori a 2 ogni 100.000 abitanti per gli uomini. In Irlanda, Regno Unito e Svizzera, i tassi di mortalità per le donne erano tra i più elevati, mentre Romania, Ungheria e Polonia hanno mostrato i tassi più bassi per entrambi i sessi. Complessivamente, il 71,4% dei paesi occidentali ha registrato tassi di mortalità maschili superiori a 1 ogni 100.000 abitanti nel 2018, rispetto al 53,8% del 2008. Per le donne, questa percentuale è salita dal 26,9% al 66,7%. L'aumento della mortalità è stato particolarmente evidente nei paesi dell'Europa orientale. In Lettonia, Lituania e Polonia si sono osservati i maggiori incrementi nei tassi medi annuali di variazione percentuale per gli uomini, mentre Lettonia, Lituania e Slovacchia hanno mostrato gli incrementi maggiori per le donne<sup>1,3,7-9</sup>.

La mortalità da eCC, al contrario, ha mostrato variazioni meno marcate. Gli incrementi osservati sono stati modesti, con una diminuzione della mortalità in numerosi paesi occidentali. Nel 2008, nessun paese aveva tassi di mortalità superiori a 1 ogni 100.000 abitanti per uomini o donne; nel 2018, questa soglia è stata superata solo nel 14,2% dei paesi per gli uomini e nel 4,8% per le donne. Inoltre, nessun paese ha riportato tassi di

mortalità per eCC superiori a 2 ogni 100.000 abitanti. In Europa, paesi come Ungheria, Austria, Germania e Svezia hanno mostrato i tassi di mortalità più alti per eCC, mentre Malta, Irlanda e Regno Unito hanno registrato i tassi più bassi. Diversamente dagli iCC, negli Stati Uniti i tassi di mortalità da eCC superano quelli del Canada, mentre in Nuova Zelanda sono più alti rispetto all'Australia. I maggiori incrementi positivi nei tassi medi annuali di variazione percentuale per eCC sono stati osservati in Norvegia, Spagna e Ungheria, mentre decrementi sono stati riportati in paesi come Danimarca, Irlanda, Italia, Paesi Bassi, Portogallo e Regno Unito<sup>1,3,7-9</sup>.

Uno dei fattori noti che contribuisce alle divergenze tra i trend di iCC ed eCC è rappresentato dagli errati, o meglio non specifici, sistemi di classificazione. La classificazione dei CC è stata soggetta a frequenti revisioni nel tempo. La versione precedente della Classificazione Internazionale delle Malattie (ICD-10) non prevedeva la presenza del pCC, che rappresenta fino al 60% dei casi di CC, come sottotipo specifico, mentre la Classificazione Internazionale delle Malattie per Oncologia (ICD-O-3; introdotta per dettagliare ulteriormente la patologia oncologica rispetto alla sola ICD) non distingue chiaramente tra i sottotipi di CC, facendo riferimento ai pCC in parte come iCC, in parte come eCC e creando quindi un'area "grigia" di classificazione. Uno studio condotto nel Regno Unito ha evidenziato l'entità del problema<sup>10</sup>. Analizzando retrospettivamente i casi diagnosticati come carcinoma epatobiliare, è emerso che solo il 43% dei casi originariamente codificati come iCC era stato correttamente classificato. Circa il 34% dei casi classificati come iCC era in realtà pCC, mentre il 92% di tutti i pCC era stato erroneamente codificato come iCC. Questo errore sistemico, che coinvolge tutti i paesi che adottavano la classificazione ICD-O-3, potrebbe in parte spiegare e tendenze divergenti osservate nei dati epidemiologici fra iCC e eCC. Solo recentemente i pCC hanno ricevuto un codice classificativo separato, grazie all'introduzione della nuova versione della classificazione ICD (ICD-11), che include codici specifici per iCC (2C12.10), pCC (2C18) e dCC (2C15.0)<sup>11</sup>. L'ICD-11 rappresenta un passo avanti per migliorare l'accuratezza dei dati epidemiologici, e studi futuri basati su questo nuovo modello potrebbero fornire una comprensione più dettagliata dei trend e dei fattori di rischio associati ai sottotipi di CC, migliorando così le strategie di prevenzione e trattamento.

### **In sintesi:**

- I tassi di mortalità per il colangiocarcinoma intraepatico (iCC) sono più alti rispetto a quelli del colangiocarcinoma extraepatico (eCC) nella maggior parte dei paesi occidentali.
- I tassi di mortalità annuali standardizzati per età per iCC sono aumentati in tutti i paesi occidentali tra il 2008 e il 2018. L'incremento maggiore è stato osservato nei paesi dell'Europa orientale (es. Lituania, Lettonia e Polonia).
- Per gli eCC, i tassi di mortalità sono rimasti generalmente stabili o in lieve aumento in alcune regioni, mentre in altri paesi (p.es., Danimarca, Italia, Regno Unito) sono diminuiti.
- Il nuovo sistema classificativo ICD-11 dei colangiocarcinomi propone un sistema più specifico con identificazione di codici specifici per iCC, eCC, e pCC. La sua introduzione in tutti i paesi potrà portare ad una valutazione oggettiva più adeguata e verosimile degli attuali tassi di incidenza e mortalità dei diversi sottotipi di CC.

### ***Sezione 1.2: Fattori di rischio e profilo molecolare***

Le differenze nella mortalità tra iCC ed eCC derivano non solo da errori di classificazione, ma anche da fattori di rischio, patogenesi, e processi oncogenetici distinti. Sebbene i due sottotipi condividano alcune cause comuni, altri fattori e meccanismi molecolari specifici rendono le loro caratteristiche epidemiologiche e cliniche uniche.

Gli iCC e gli eCC condividono fattori di rischio come parassitosi epatiche (p.es., liver flukes) e colangite sclerosante primitiva (PSC)<sup>4,12</sup>. Tuttavia, esistono differenze chiave anche in base alla localizzazione geografica: nei paesi occidentali, le malattie croniche del fegato, tra cui epatite virale, consumo di alcol e steatosi epatica non alcolica, sono associate prevalentemente agli iCC, mentre le malattie biliari, come la calcolosi biliare, sono più correlate agli eCC; le parassitosi epatiche, invece, sono sostanzialmente appannaggio della sola popolazione del sud-est asiatico. Di conseguenza, l'aumento della mortalità da iCC potrebbe anche riflettere l'incidenza crescente di condizioni epatiche croniche nella popolazione occidentale, così come la diminuzione della mortalità da eCC può essere attribuita all'incremento della pratica di interventi chirurgici precoci per calcolosi

biliare<sup>4,12</sup>. A questi, si aggiungono ulteriori fattori di rischio che, seppur rilevanti, contribuiscono in modo meno significativo ai dati epidemiologici di CC (p.es., cisti del coledoco e Malattia di Caroli)<sup>4,12</sup>.

Nonostante la presenza di fattori di rischio consolidati, la maggior parte dei CC è di natura sporadica, senza cause specifiche identificabili. Diversamente da altre neoplasie, la carcinogenesi nel CC coinvolge molteplici processi cellulari complessi, risultando in una eterogeneità del CC anche dal punto di vista molecolare, genetico, ed epigenetico. Peraltro, l'elevata eterogeneità genomica, sia intertumorale che intratumorale, ha implicazioni significative per la stratificazione dei pazienti e lo sviluppo di terapie personalizzate. Recenti progressi tecnologici in ambito di profilazione genomica hanno permesso di evidenziare alterazioni genetiche specifiche per sede anatomica che influenzano l'insorgenza e la progressione del CC<sup>13-21</sup>. Gli iCC mostrano mutazioni genetiche predominanti nei pathway legati alla rimodellazione della cromatina, al metabolismo cellulare e alla regolazione del ciclo cellulare. Geni come *BAP1* (9%-25% dei casi), *IDH1/2*, *ARID1A* (19%-22%), *IDH1/2* (15%-20%) e *FGFR2* (10%-15%) sono, infatti, frequentemente alterati. Diversamente, gli eCC mostrano mutazioni più frequenti in geni come *KRAS*, *TP53*, *SMAD4* e *STK11*, suggerendo pathway oncogenetici distinti rispetto agli iCC. Nei pCC, mutazioni in *RBM10*, *TGFBR2*, *PIK3R1*, *ELF3* e *METTL14* evidenziano ulteriori, differenti alterazioni specifiche nella regolazione post-trascrizionale. Anche l'eziologia può influenzare il panorama mutazionale del CC: nei CC associati a parassiti epatici, mutazioni in *TP53* (44,4%), *KRAS* (16,7%) e *SMAD4* sono prevalenti, mentre nei CC non associati, mutazioni in *BAP1* e *IDH1/2* sono più comuni. Nei CC associati a PSC, mutazioni in *TP53* (30%-35,5%) e *KRAS* (16%-28%) sono comuni, con aberrazioni genetiche specifiche legate allo stadio della malattia<sup>13-21</sup>.

#### **In sintesi:**

- Il CC esemplifica la complessa della patogenesi del cancro, guidata dall'interazione di fattori genetici, epigenetici, e microambientali. Il panorama genetico del CC è caratterizzato da una significativa eterogeneità, spesso associata alla diversa localizzazione anatomica (iCC-pCC-dCC) ma anche alla diversa eziopatogenesi/fattori di rischio (parassitosi epatica, PSC).

- In base alla sede anatomica, mutazioni di *BAP1*, *IDH1/2*, *ARID1A*, *PBRM1* e *FGFR2* sono più comuni nei iCC, mentre le mutazioni di *KRAS*, *TP53*, *SMAD4* e *STK11* nei eCCA. Recentemente, studi mirati su pCC hanno identificato mutazioni di *RBM10*, *TGFBR2*, *PIK3R1*, *ELF3*, *NACC1* e *METTL14* come più specifiche di questo sottogruppo.
- *BAP1* e *IDH1/2* sono più frequentemente mutati nei CC non associati ai parassiti epatici, mentre *TP53*, *SMAD4*, *KMT2C* e *GNAS* mostravano il pattern opposto. I CC associati a PSC mostrano una frequenza elevata di mutazioni in *TP53*, *KRAS*, e *HER2*.

### **Sezione 1.3:** *Microambiente immunitario peritumorale del colangiocarcinoma e confronto con colangiopatie non-neoplastiche*

La natura maligna del CC è caratterizzata da un complesso ambiente peritumorale costituito da cellule tumorali, cellule stromali, e cellule del sistema immunitario. L'insieme di queste cellule, delle loro interazioni, e delle citochine/chemochine rilasciate vanno a costituire il microambiente immunitario peritumorale (TIME) che, nel caso del CC, risulta efficacemente immunosoppressivo<sup>22-24</sup>. In generale, i tumori sensibili all'azione del sistema immunitario (e di conseguenza, sensibili all'immunoterapia, vedi paragrafo successivo) presentano elevato carico mutazionale tumorale e instabilità dei microsatelliti/deficienza del mismatch repair (MSI/MMR-D)<sup>25-30</sup>. Queste caratteristiche determinano la produzione di numerosi neo-antigeni da parte della massa tumorale, neoantigeni che vengono identificati dalle cellule presentante l'antigene (APC) per attivare la risposta adattativa antigene-specifica del sistema immunitario<sup>29</sup>. Come meccanismo di difesa e di evasione immunitaria, le cellule tumorali inducono l'espressione di marcatori di senescenza ed esaurimento sulle cellule immunitarie (c.d., marcatori di checkpoint immunitario, fra i quali PD-1, PD-L1, CTLA4, LAG3, e TIM3), portando ad una, seppur reversibile, inibizione completa della risposta anti-tumorale. Per questo motivo, questi tumori sono particolarmente sensibili all'azione degli inibitori di checkpoint immunitari (ICI), i quali ri-attivano la risposta immunitaria contro le cellule tumorali.

Il CC fa parte di una tipologia di neoplasie definite immunologicamente "fredde", le quali presentano un basso tasso di MSI/MMR-D, eterogeneità mutazionale, scarsa infiltrazione

linfocitaria e bassa espressione di PD1 e PD-L1. Queste caratteristiche di bassa attività immunologica non dovrebbero sorprendere, considerando la risposta marginale osservata con i protocolli di immunoterapia<sup>14,25,27</sup>. Difatti, marcatori predittivi classici dell'efficacia dei ICI, come l'espressione di PD-L1 e lo stato di MSI/MMR-D, non si sono dimostrati efficaci nell'identificare pazienti affetti da CC responsivi al trattamento con ICI e, pertanto, la loro affidabilità nel contesto del CC rimane oggetto di dibattito<sup>31-34</sup>. È da notare, tuttavia, come la valutazione dell'espressione di PD-L1 nel CC sia ancora scarsamente standardizzata, con diversi approcci metodologici utilizzati, come l'analisi delle sole cellule tumorali<sup>35-39</sup>, delle sole cellule immunitarie<sup>36,38</sup> o di entrambe le popolazioni combinate<sup>24,39-41</sup>, portando a un'ampia variabilità nei casi positivi riportati (10-70%) in diversi studi e trial clinici, nonostante l'omogeneità di trattamento utilizzato<sup>42-48</sup>.

Diversi meccanismi rendono il TIME del CC immunosoppressivo. La segnalazione del trasduttore del segnale e attivatore della trascrizione 3 (STAT3) è implicata nella soppressione dei linfociti T citotossici (CTL), poiché la riduzione di STAT3 nei TAM (macrofagi associati al tumore) e nei TAN (neutrofili associati al tumore) comporta la perdita dei loro effetti pro-tumoral<sup>41,49,50</sup>. Il cluster di differenziazione 47 (CD47) è una glicoproteina di transmembrana anti-fagocitica con presenza ubiquitaria sulla superficie delle cellule umane. È stata osservata un'espressione aumentata di CD47 sulle cellule di CC come mezzo per prevenire la fagocitosi delle cellule tumorali e per evitare la morte cellulo-mediata dal sistema immunitario. Il trattamento con anti-CD47 nei modelli preclinici di CC ha portato a un aumento della fagocitosi da parte dei macrofagi<sup>51,52</sup>. La proteina Fas/Fas ligando (FasL) è stata anche implicata come strategia di fuga immunitaria tumorale utilizzata dalle cellule di iCC, poiché l'aumento dell'espressione induce apoptosi dei CTL e delle cellule NK<sup>53-57</sup>.

Un ulteriore meccanismo essenziale di evasione immunitaria tumorale è l'aumentata espressione delle molecole di checkpoint immunitario nel TIME<sup>24,26,31,34,35,37,58-61</sup>. PD-L1 interagisce con PD-1, determinando l'inibizione della funzione delle cellule T effettrici. Nei CC murini e umani, i TAM PD-L1+ mostrano un'espressione aumentata e sono probabilmente la principale fonte di PD-L1 nei CC. Di conseguenza, i TAM sono stati implicati nell'inizio e nella propagazione di una barriera immunosoppressiva attorno ai

CC, con una conseguente attenuazione della funzionalità delle cellule immunitarie citotossiche (CTL e cellule NK). L'analisi di RNA-sequencing a singola cellula di otto iCC e dei tessuti adiacenti ha rilevato che i Treg infiltranti il tumore mostrano alti livelli di marcatori immunosoppressivi, inclusa la proteina associata ai linfociti T citotossici 4 (CTLA-4) e il recettore T-cellulare con domini Ig e ITIM. CTLA-4 è un'altra molecola di checkpoint immunitario che si lega al CD80 sulle cellule che presentano l'antigene e inibisce l'attivazione delle cellule T citotossiche<sup>48-52</sup>.

Lo studio e classificazione del TIME nei CC ha portato all'identificazione di sottotipi o sottoclassi di CC caratterizzati da differenti meccanismi di evasione immunitaria e diversi risultati clinici<sup>62</sup>. Una classificazione immunitaria del iCC derivata da dati trascrittomici di massa di 198 casi di iCC resecati ha identificato quattro sottotipi differenti: "immune desert", "immunogenic", "myeloid" e "mesenchymal"<sup>62</sup>. La maggior parte dei CC è stata identificata come appartenente alla sottoclasse "immune desert". Allo stesso modo, una classificazione TIME basata su dati trascrittomici di massa ha stratificato 961 pazienti con iCCA ha identificato la maggioranza dei casi di iCC (65%) come caratterizzati da un profilo non infiammato<sup>63</sup>.

In sintesi, questi dati indicano il complesso sistema immunosoppressivo del TIME del CC e forniscono una spiegazione per le risposte cliniche inferiori alla media osservate nei pazienti con CC trattati con ICI in monoterapia. Questi stessi dati, tuttavia, sembrano contraddire l'efficace distruzione mediata dai linfociti T e la quasi completa eliminazione dei colangiociti osservata nelle colangiopatie croniche necro-infiammatorie mediate dal sistema immunitario [es. rigetto acuto e cronico cellulo-mediato post-allotrapianto, malattia del trapianto contro l'ospite (GVHD) e colangite biliare primitiva (PBC)]<sup>64-80</sup>. I meccanismi che regolano il danno immunomediato ai dotti biliari e il microambiente immunitario di queste colangiopatie immunomediate includono: (1) la capacità dei colangiociti di funzionare come APC attraverso l'incrementata regolazione ed espressione del complesso maggiore di istocompatibilità di classe II (MHCII)<sup>81-85</sup>; (2) l'espressione di marker di esaurimento sui linfociti T infiltranti come LAG3, HAVCR2 (noto anche come TIM3) e Galectina-9 (Gal-9)<sup>86-99</sup>; e (3) la regolazione della disponibilità di triptofano per

l'attivazione dei linfociti tramite l'attività enzimatica dell'indoleamina 2,3-diossigenasi (IDO) e della triptofano 2,3-diossigenasi (TDO2)<sup>100-104</sup>.

In particolare, le galectine sono una famiglia di proteine altamente conservate, caratterizzate dalla capacità di riconoscere e legarsi ai  $\beta$ -galattosidi e da una specifica sequenza di circa 130 amminoacidi che costituisce il dominio di riconoscimento dei carboidrati (CRD)<sup>105-109</sup>. Alle galectine sono state attribuite diverse funzioni, principalmente legate al metabolismo cellulare, all'infiammazione e alla modulazione immunitaria<sup>105-109</sup>. In particolare, Gal-9, una galectina di 36 kDa con doppio CRD trascritta dal gene *LGALS9* situato sul cromosoma 17q11.2, è stata descritta per la prima volta nei campioni di rene di topo e nel linfoma di Hodgkin umano come chemochina per eosinofili<sup>110,111</sup>. La Gal-9 è risultata coinvolta nella regolazione delle cellule immunitarie, nell'aggregazione cellulare e nell'adesione, principalmente interagendo con il recettore TIM-3, un recettore di membrana espresso dai linfociti T helper 1, T helper 17, e dalle cellule T regolatorie, oltre che associato all'esaurimento dei linfociti T. Infatti, la via TIM-3/Gal-9 è stata recentemente valutata come potenziale bersaglio per la terapia con inibitori di checkpoint, ma non sono state fornite analisi specifiche per il microambiente immunitario del CC<sup>91,112-119</sup>.

#### **In sintesi:**

- Il microambiente tumorale complica ulteriormente il panorama clinico e terapeutico del CC, con fibroblasti e macrofagi associati al tumore e altre cellule immunitarie che generano una nicchia immunosoppressiva, favorendo crescita e aggressività del CC.
- Diversi fattori sono stati considerati responsabili di questo ambiente immunosoppressivo, fra cui un basso carico mutazionale tumorale, un basso tasso di MSI/MMR-D, e l'espressione di vie alternative di inibizione dei checkpoint immunitari rispetto al pathway PD-1/PD-L1.
- Queste caratteristiche diversificate sottolineano la complessità della carcinogenesi del CC e contrastano con l'efficace distruzione dei colangiociti (da cui il CC deriva) da parte del sistema immunitario osservato nelle colangiopatie immunomediate.

#### ***Sezione 1.4: Linee terapeutiche disponibili, immunoterapia, e trial clinici in corso***

Negli ultimi anni, la gestione del CC avanzato o metastatico ha visto significativi progressi, grazie soprattutto all'introduzione delle terapie mirate su target molecolari. Tradizionalmente, la prognosi dei pazienti con CC avanzato è stata sfavorevole, con opzioni terapeutiche limitate alla chirurgia, alla chemioterapia convenzionale e ai trattamenti locoregionali, come la radioembolizzazione e l'ablazione con radiofrequenza, spesso combinati<sup>120,121</sup>. Tuttavia, questi approcci non sempre hanno garantito risultati soddisfacenti, raggiungendo una OS di 11,7 mesi e una PFS di 8,0 mesi<sup>4-6</sup>. Recentemente, le terapie mirate hanno rivoluzionato il panorama terapeutico, migliorando significativamente la sopravvivenza nei sottogruppi di pazienti in cui alterazioni genetiche rilevanti vengono identificate.

Tra i farmaci approvati vi sono l'ivosidenib per le mutazioni di IDH1<sup>122</sup>, pemigatinib, infigratinib e futibatinib per fusioni o riarrangiamenti di FGFR2<sup>123-125</sup>, e dabrafenib in combinazione con trametinib per mutazioni BRAF V600E<sup>126</sup>. Inoltre, pertuzumab e trastuzumab hanno dimostrato efficacia nei pazienti con amplificazioni o mutazioni di HER2<sup>127</sup>, mentre inibitori della tirosin-chinasi del recettore NTRK, come entrectinib e larotrectinib, hanno evidenziato attività antitumorale nei pazienti con fusioni NTRK<sup>128</sup>. Altre terapie mirate includono olaparib e rucaparib per le mutazioni BRCA1/2 e PALB2, adagrasib per le mutazioni KRAS G12C, e pembrolizumab per pazienti con profilo MSI/MMR-D<sup>129</sup>.

Le alterazioni genetiche bersagliabili sono comuni nei pazienti con CC, con una prevalenza stimata tra il 38% e il 48%<sup>16,127,130,131</sup>. Inoltre, alcuni pazienti presentano più di un tipo di alterazione genetica, offrendo ulteriori opportunità terapeutiche<sup>127,131</sup>. Questa alta frequenza di alterazioni ha spinto l'adozione di test molecolari nei pazienti con malattia avanzata idonei a trattamenti sistemici, come raccomandato dalla Società Europea di Oncologia Medica (ESMO)<sup>129</sup>. L'ESMO ha introdotto la Scala per l'Azione Clinica dei Bersagli Molecolari (ESCAT), che classifica le alterazioni genomiche in base alla loro rilevanza clinica<sup>129</sup>. Le alterazioni di livello I, come fusioni FGFR2 e mutazioni IDH1, sono considerate idonee per la pratica clinica di routine<sup>132</sup>. Studi recenti mostrano che la prevalenza di tali alterazioni è particolarmente alta nei pazienti italiani con CC,

confermando l'importanza del profilo molecolare nel nostro paese<sup>133,134</sup>. Negli Stati Uniti, diversi farmaci mirati sono approvati per il trattamento del CC, tra cui pemigatinib, infigratinib, futibatinib e ivosidenib. Il pembrolizumab è disponibile per tumori MSI/MMR-D. Nell'Unione Europea, il pemigatinib è l'unica terapia mirata attualmente approvata per pazienti con fusioni FGFR2, mentre in Italia è l'unico farmaco rimborsato per questa indicazione. Futibatinib e zanidatamab, disponibili tramite programmi di accesso esteso, rappresentano ulteriori opzioni per i pazienti italiani. L'ivosidenib ha recentemente ricevuto un parere positivo dal Comitato per i Medicinali per Uso Umano (CHMP) dell'Agenzia Europea per i Medicinali (EMA), con un'approvazione attesa a breve.

Le linee guida italiane dell'Associazione Italiana per lo Studio del Fegato (AISF) raccomandano il profilo molecolare per i pazienti da trattare con terapie mirate o per l'arruolamento in studi clinici<sup>135</sup>. Tuttavia, non ne suggeriscono l'esecuzione al momento della diagnosi. Le linee guida della Federazione dei Gruppi Cooperativi Oncologici Italiani (FICOG) e dell'Istituto Superiore di Sanità (ISS) raccomandano l'uso di sequenziamento di nuova generazione (NGS) per identificare alterazioni molecolari, preferibilmente sul campione tumorale più recente<sup>136</sup>. L'NGS dovrebbe essere effettuato prima della terapia di prima linea, quando sono disponibili terapie mirate<sup>136,137</sup>. Recenti linee guida rinforzano ulteriormente questo concetto e approccio<sup>138</sup>.

L'uso recente di ICI in monoterapia nei pazienti con CC ha avuto un successo limitato, come evidenziato dagli studi su Pembrolizumab e Nivolumab [entrambi mirano alla proteina di morte programmata 1 (PD-1)]<sup>139,140</sup>. In particolare, Pembrolizumab ha indotto un tasso di risposta globale marginale, compreso tra il 5,8% (KEYNOTE-158, ClinicalTrials.gov identifier: NCT02628067) e il 13,0% (KEYNOTE-028, NCT02054806)<sup>33,141</sup>. Due studi clinici (JapicCTI-153098 e NCT02829918) hanno rivelato risultati simili con Nivolumab [JapicCTI-153098: la sopravvivenza globale mediana era di 5,2 mesi per il braccio con monoterapia e 15,4 mesi per il braccio con terapia combinata; NCT02829918: la sopravvivenza globale mediana era di 14,22 mesi]<sup>32,142</sup>. Al contrario, lo studio TOPAZ-1 (NCT03875235) ha mostrato dati più promettenti: i pazienti trattati con Durvalumab [un inibitore del ligando di morte programmata-1 (PD-L1)] e chemioterapia (gemcitabina e cisplatino) hanno avuto una sopravvivenza globale (OS) mediana di 12,8 mesi e una

sopravvivenza libera da progressione mediana di 7,2 mesi, rispetto agli 11,5 mesi di OS e ai 5,7 mesi di sopravvivenza libera da progressione mediana del braccio trattato con sola chemioterapia<sup>143</sup>.

L'introduzione delle terapie mirate ha rivoluzionato la gestione del CC, consentendo un approccio personalizzato e migliorando significativamente la sopravvivenza e la qualità di vita dei pazienti. Il profilo molecolare, basato su NGS, è diventato fondamentale per identificare alterazioni genetiche bersagliabili e ottimizzare i trattamenti. L'ulteriore sviluppo di farmaci mirati e l'espansione delle indicazioni promettono di aumentare le opzioni terapeutiche disponibili. In un contesto oncologico storicamente caratterizzato da una prognosi sfavorevole, questi progressi rappresentano una svolta significativa.

#### **In sintesi:**

- La prognosi per i pazienti con CC avanzato o metastatico è migliorata con l'introduzione di terapie mirate, tra cui ivosidenib (IDH1), pemigatinib, infigratinib e futibatinib (FGFR2), pertuzumab e trastuzumab (HER2), e dabrafenib e trametinib (BRAF V600E).
- Le linee guida internazionali, tra cui quelle dell'ESMO, raccomandano il profilo molecolare per i pazienti con CC avanzato, utilizzando tecnologie come il sequenziamento di nuova generazione (NGS) per identificare alterazioni genetiche bersagliabili.
- Gli inibitori dei checkpoint immunitari, come Pembrolizumab e Nivolumab, hanno mostrato tassi di risposta marginali nei pazienti con CC in monoterapia. Tuttavia, combinazioni come Durvalumab con chemioterapia (gemcitabina e cisplatino) hanno offerto miglioramenti modesti nella sopravvivenza globale rispetto alla sola chemioterapia.

### ***Sezione 1.5: Scopo ed aree di interesse dello studio presentato***

In considerazione della marginale risposta dei CC all'immunoterapia, emergono due ipotesi: (1) la prima, prevede una risposta immunitaria quasi del tutto assente contro le cellule tumorali di CC che rende il trattamento con ICI irrilevante; (2) la seconda, ipotizza meccanismi di evasione immunitaria multifattoriali utilizzati dalle cellule tumorali di CC, diversi da quelli osservati in altri tumori più suscettibili all'immunoterapia.

Sulla base dei dati e delle considerazioni fin qui riportati, questo studio ha indagato se i percorsi che portano alla distruzione immunomediata completa dei colangiociti nelle colangiopatie non-neoplastiche siano preservati o alterati nel microambiente immunitario dei CC. In una coorte di un unico centro, abbiamo analizzato i profili genomici, trascrittomici e proteomici dei CC, caratterizzando l'interazione tra il fenotipo delle cellule tumorali e il microambiente immunitario circostante. Abbiamo valutato il fenotipo e la densità dei linfociti infiltranti il tumore (TILs) e abbiamo valutato semi-quantitativamente i fenotipi delle cellule tumorali dei CC, esaminando l'espressione proteica immunohistochimica (IHC) di marker di risposta immunitaria, proprietà di presentazione dell'antigene/immunogenicità cellulare (MHCI, MHCII), molecole di checkpoint immunitario/marker di esaurimento dei linfociti (PD-1, LAG3, TIM3, Gal-9 e PD-L1) e, infine, PD-L1, LAG3 e Gal-9 come possibili bersagli per l'immunoterapia.

## Capitolo 2. Materiali e Metodi

### Sezione 2.1: Reclutamento pazienti e raccolta dati clinico-patologici

In collaborazione con il Dipartimento di Patologia del Fegato e dei Trapianti dell'Università di Pittsburgh, sono stati raccolti retrospettivamente 113 casi di CC chirurgicamente resecati e diagnosticati tra ottobre 2006 e gennaio 2014. I dati demografici, clinici e patologici sono stati riassunti nella **Tabella 1**.

**Tabella 1. Caratteristiche cliniche, demografiche, e istopatologiche della nostra corte di CC.**

| Variabili                                   |                      | Totale (n=113)   | Percentuale (%) |
|---|----------------------|------------------|-----------------|
| <b>Demografiche</b>                         |                      |                  |                 |
| Sesso                                       | Femminile            | 55               | 48.7            |
|   | Maschile             | 58               | 51.3            |
| Età alla resezione                          | Mediana - anni (IQR) | 68 (61-74)       | ---             |
|   | Mediana (IQR)        | 26 (22.9-31.2)   | ---             |
| BMI (kg/m <sup>2</sup> )                    | < 25                 | 45               | 39.8            |
|   | > 25                 | 61               | 54.0            |
|   | N.A.                 | 7                | 6.2             |
|   |                      |                  |                 |
| Etnia                                       | Caucasica            | 107              | 94.6            |
|   | Afro-Americana       | 2                | 1.8             |
|   | Asiatica             | 1                | 0.9             |
|   | Hispanica            | 2                | 1.8             |
|   | N.A.                 | 1                | 0.9             |
| <b>Fattori di rischio</b>                   |                      |                  |                 |
| Fumo  | No                   | 62               | 54.9            |
|   | Si                   | 49               | 43.4            |
|   | N.A.                 | 2                | 1.8             |
| Abuso di alcol                              | No                   | 96               | 84.9            |
|   | Si                   | 15               | 13.3            |
|   | N.A.                 | 2                | 1.8             |
| PSC   | No                   | 104              | 92.0            |
|   | Si                   | 8                | 7.1             |
|   | N.A.                 | 1                | 0.9             |
| Malattia colestatica cronica                | No                   | 104              | 92.0            |
|   | Si                   | 8                | 7.1             |
|   | N.A.                 | 1                | 0.9             |
| Malattia epatica cronica                    | Virale               | 2 (1 HBV, 1 HCV) | 1.8             |
|   | Non-virale           | 6                | 5.3             |
| Familiarità/<br>Predisposizione<br>Genetica | No                   | 104              | 92.0            |
|   | Si                   | 2 <sup>s</sup>   | 1.8             |
|   | N.A.                 | 7                | 6.2             |
| Diabete                                     | No                   | 86               | 76.1            |
|   | Si                   | 26               | 23.0            |
|   | N.A.                 | 1                | 0.9             |
| Carbohydrate antigen                        | Mediana (IQR)        | 159.15           | ---             |

|   |                        |                 |      |
|---|------------------------|-----------------|------|
| <b>19-9 (CA 19-9)<sup>†</sup></b>                 |                        | (50.7-768.2)    |      |
|   | <b>Negativo</b>        | 20              | 17.7 |
|   | <b>Positivo</b>        | 92              | 81.4 |
|   | <b>N.A.</b>            | 1               | 0.9  |
|   | <b>Mediana (range)</b> | 2.1 (1.4 – 4.7) | ---  |
| <b>Carcinoembryonic antigen (CEA)<sup>*</sup></b> | <b>Negativo</b>        | 34              | 30.1 |
|   | <b>Positivo</b>        | 77              | 68.1 |
|   | <b>N.A.</b>            | 2               | 1.8  |
| <b>Patologiche</b>                                |                        |                 |      |
|   | <b>Negativo</b>        | 62              | 54.8 |
| <b>Margini di resezione</b>                       | <b>Positivo</b>        | 49              | 43.4 |
|   | <b>N.A.</b>            | 2               | 1.8  |
|   | <b>No</b>              | 25              | 22.1 |
| <b>Linfonodi</b>                                  | <b>Yes</b>             | 87              | 77.0 |
|   | <b>N.A.</b>            | 1               | 0.9  |
| <b>Localizzazione</b>                             | <b>iCC</b>             | 49              | 43.4 |
|   | <b>eCC</b>             | 64              | 56.6 |
|   | <b>1</b>               | 7               | 6.2  |
|   | <b>2</b>               | 33              | 29.2 |
|   | <b>2a</b>              | 10              | 8.8  |
| <b>pT</b>   | <b>2b</b>              | 5               | 4.4  |
|   | <b>3</b>               | 40              | 35.4 |
|   | <b>4</b>               | 17              | 15.0 |
|   | <b>N.A.</b>            | 1               | 0.9  |
|   | <b>0</b>               | 46              | 40.7 |
| <b>pN</b>   | <b>1</b>               | 41              | 36.3 |
|   | <b>X</b>               | 26              | 23.0 |
|   | <b>G1</b>              | 6               | 5.3  |
| <b>Grado di differenziazione</b>                  | <b>G2</b>              | 83              | 73.4 |
|   | <b>G3</b>              | 21              | 18.6 |
|   | <b>N.A.</b>            | 3               | 2.7  |

§: Due casi con predisposizione genetica sono risultati rispettivamente positivi allo screening per syndrome di Lynch (n=1) e a storia familiare di malignità multiple idiopatiche.

†: CA 19-9 considerato positive se > 37 U/mL.

\*: CEA considerato positive se > 2 ng/mL.

Tutti i campioni sono stati de-identificati e ottenuti con l'approvazione del Comitato Etico dell'Università di Pittsburgh (STUDY20060166), ed il consenso informato è stato esonerato. Tutta la ricerca è stata condotta in conformità con le Dichiarazioni di Helsinki e Istanbul e successivi aggiornamenti.

### **Sezione 2.2: Indagini istopatologiche “tradizionali”**

Sezioni istologiche colorate con ematossilina ed eosina (H&E) sono state esaminate per confermare la diagnosi, valutare l'adeguatezza del campione e selezionare le aree

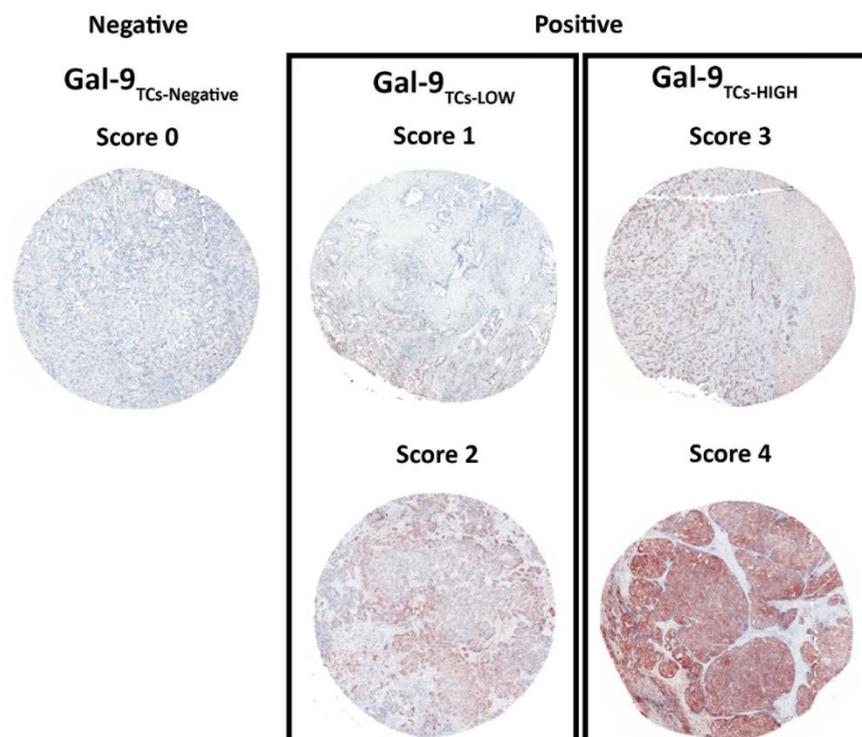
tumorali rappresentative. È stato ottenuto un singolo core con tessuto tumorale vitale dal blocco originale fissato in formalina ed incluso in paraffina (FFPE) utilizzando un punch biotico da 2 mm (Miltex, Inc., York, PA, USA) per costruire blocchi di microarray tissutale (TMA). La costruzione dei TMA ha una campionatura tissutale variabile; di conseguenza, la quantità di cellule tumorali variava tra i core. Da ciascun blocco TMA, è stata esaminata una sezione di 4 µm colorata con H&E per il controllo qualità, inclusa la conferma della presenza di cellule tumorali. Le sezioni aggiuntive sono state sottoposte a colorazione immunohistochimica (IHC) singola, basata su avidina-biotina con sviluppo del cromogeno per CD8, Gal-9, LAG3, TIM3, PD-1, PD-L1, MHC1, MHCII, MLH-1, PMS-2, MSH-6, PMS2 e TDO2. La colorazione per MLH-1, PMS-2, MSH-6 e MSH-2 è stata eseguita presso il Laboratorio Clinico di Istologia del UPMC. I controlli positivi e negativi interni sono stati valutati in ogni core per escludere falsi negativi e positivi e confermare la conservazione dell'antigenicità tissutale. I campioni senza cellule tumorali residue, la mancanza di controlli interni positivi o con rese di colorazione subottimali sono stati esclusi dalle analisi successive. Tutte le sezioni TMA sono state scansionate con uno scanner ZEISS Axioscan Z1 (Carl Zeiss, Oberkochen, Germania) dotato di una fotocamera 3-CCD a 16 bit (Hitachi Kokusai Electric, Tokyo, Giappone). La risoluzione di acquisizione è di 0,111 mm/pixel (40x, obiettivo con apertura numerica 0,95). L'analisi delle immagini digitali è stata condotta utilizzando NearCYTE (<http://nearcyte.org/>) come definito di seguito.

L'espressione delle proteine MMR (MLH-1, MSH-2, MSH-6, PMS2) è stata valutata nei nuclei delle cellule tumorali di CC. Per ciascuna proteina, i campioni sono stati classificati come positivi (cioè, con almeno una colorazione nucleare lieve) o negativi. Le cellule non neoplastiche sono state utilizzate come controlli interni positivi. I campioni con colorazione negativa per una (o più) delle proteine MMR nei nuclei delle cellule tumorali di CC sono stati classificati come MSI/MMR-deficienti (MSI/MMR-d). I campioni con espressione positiva di tutte le proteine MMR sono stati classificati come stabili ai microsatelliti/MMR intatti (MSS/MMR-I).

L'espressione di PD-L1 è stata valutata utilizzando sia il punteggio combinato positivo (PD-L1-CPS, definito come il rapporto tra le cellule tumorali e le cellule immunitarie positive per PD-L1 rispetto al numero totale di cellule tumorali vitali  $\times 100$ ) sia il punteggio di proporzione tumorale (PD-L1-TPS; definito come il rapporto tra il numero di cellule

tumorali positive per PD-L1 rispetto al numero totale di cellule tumorali vitali  $\times 100$ ), con l'applicazione dei corrispondenti valori soglia. I valori soglia per il PD-L1-CPS erano PD-L1-CPS  $<1$  (PD-L1-CPS-0), PD-L1-CPS 1–10 (PD-L1-CPS-1) e PD-L1-CPS  $\geq 10$  (PD-L1-CPS-2). I valori soglia per il PD-L1-TPS erano PD-L1-TPS  $<1\%$  (PD-L1-TPS-0), PD-L1-TPS 1–49% (PD-L1-TPS-1) e PD-L1-TPS  $\geq 50\%$  (PD-L1-TPS-2). Sono state considerate solo le cellule tumorali di CC che mostravano una colorazione lineare parziale o completa della membrana con qualsiasi intensità. Per il PD-L1-CPS, le cellule immunitarie sono state identificate come qualsiasi cellula immunitaria mononucleare (cioè linfociti e macrofagi) localizzata nel TP-IM e quantificata, come riportato sopra.

L'espressione di MHC1, MHCII, LAG3 e TDO2 nelle cellule tumorali è stata classificata come negativa (espressione in  $<1\%$  delle cellule tumorali; MHC1-TCs-Negative, MHCII-TCs-Negative, LAG3-TCs-Negative e TDO2-TCs-Negative) o positiva (qualsiasi espressione in  $\geq 1\%$  delle cellule tumorali; MHC1-TCs-Positive, MHCII-TCs-Positive, LAG3-TCs-Positive e TDO2-TCs-Positive). L'espressione di Gal-9 nelle cellule tumorali è stata riportata come negativa (espressione in  $<1\%$ ; Gal-9-TCs-Negative), bassa (espressione tra 1-50%; Gal-9-TCs-Low) o alta (espressione  $>50\%$ ; Gal-9-TCs-High) (**Figura 2**).



**Figura 2.** Rappresentazione schematica dello score adottato per la valutazione di Gal-9 sui TMA e relativa resa immunohistochimica.

### **Sezione 2.3: Indagini di “Next-Generation Pathology” e molecolari**

**Analisi TILs:** La quantificazione dei linfociti tumorali infiltranti (TILs) è stata effettuata definendo manualmente il confine periferico del tumore, seguita da un'analisi automatizzata delle immagini cromogeniche di IHC per il conteggio delle popolazioni cellulari. La distanza del confine periferico del tumore è stata fissata a 250  $\mu\text{m}$ , una zona in cui l'influenza reciproca tra tumore e microambiente immunitario diminuisce significativamente. Un patologo (AG) ha mantenuto questo buffer spaziale disegnando una forma poligonale a mano libera per indicare il confine del microambiente tumorale e peritumorale combinato (TP-IM). A causa del campionamento per TMA, se un core tissutale era interamente composto da tumore, l'intera area del core è stata utilizzata. In modo simile, se un core non conteneva tumore, è stato scartato per questa analisi. Qualsiasi linfocita situato all'interno dei confini del TP-IM è stato definito come TIL e ulteriormente caratterizzato tramite analisi di immagini successive.

Per automatizzare il conteggio dei TIL esprimendo i biomarcatori di interesse (CD8, Gal-9, LAG3, TIM3, PD-1 e MHCII), è stato utilizzato un software (NearCYTE) che impiega deconvoluzione dei colori, morfologia e segmentazione bayesiana per identificare i nuclei nelle immagini intere delle sezioni (WSI). Filtri di dimensione e forma morfologica sono stati applicati per escludere nuclei rappresentati longitudinalmente e nuclei troppo grandi (o troppo piccoli). Per identificare la posizione spaziale dei TIL in base al confine TP-IM definito dal patologo, l'area poligonale annotata è stata sovrapposta al core tissutale e sono stati conservati solo i centri nucleari situati all'interno di quell'area. I risultati del conteggio automatizzato dei TIL sono stati esaminati da un patologo (AG) per verificarne l'accuratezza prima di procedere. Il numero totale di TIL positivi per un determinato marcatore in ciascun core è stato normalizzato all'area totale del TP-IM (TIL positivi/ $\text{mm}^2$ ).

**Analisi genomica:** I core tissutali sono stati prelevati dai blocchi FFPE utilizzando un punch per biopsia da 2 mm (Miltex, Inc., York, PA, USA), e il DNA genomico è stato estratto e purificato utilizzando il kit QIAmp DNA FFPE Tissue (Qiagen, Germantown, MD, USA). Il DNA è stato analizzato presso l'UPMC Hillman Cancer Center – Cancer Genomics Facility (direttore William A. LaFramboise) utilizzando il pannello Ion AmpliSeq Comprehensive

Cancer Panel (409 geni) sulla piattaforma Ion Torrent (ThermoFisher Scientific, Inc., Waltham, MA, USA). I dati grezzi sono pubblicamente disponibili nell'archivio Sequence Read Archive (SRA database).

*Analisi trascrittomiche:* L'RNA è stato estratto dai core tissutali utilizzando il kit RNeasy FFPE (Qiagen), sottoposto a controllo di qualità e ibridato al pannello di espressione genica NanoString nCounter® PanCancer IO 360 (NanoString Technologies, Seattle, WA, USA). I dati sono stati normalizzati utilizzando il software di analisi nSolver (versione 4.0.70, RRID:SCR\_003420) e analizzati tramite la piattaforma online ROSALIND® per la scoperta e l'elaborazione dei dati (ROSALIND, Inc.; San Diego, CA). Le variazioni di espressione trascrittomiche tra i gruppi e la relativa significatività statistica sono state calcolate utilizzando il metodo Fast (che applica un modello binomiale negativo semplificato per tutte le sonde). L'aggiustamento della significatività statistica è stato effettuato utilizzando il metodo di Benjamini-Hochberg per la stima dei tassi di falsi positivi. I dati grezzi sono pubblicamente disponibili nel database Genomic Expression Omnibus (GEO database).

#### **Sezione 2.4: Analisi statistiche**

Tutti i dati sono stati valutati per la normalità della distribuzione utilizzando il test di Shapiro-Wilk. Sono stati utilizzati test parametrici e non parametrici per valutare le correlazioni tra le variabili (l'uso specifico è indicato nelle aree specifiche del testo). Tutti i test erano a due code e le analisi sono state considerate significative con un intervallo di confidenza del 95% ( $p \leq 0.05$ ). Tutte le variabili relative al "tempo di evento" sono state valutate a partire dalla data dell'intervento chirurgico. La sopravvivenza globale (OS) è stata calcolata in base alla data di morte o all'ultimo follow-up clinico. Per calcolare la sopravvivenza libera da recidiva (RFS), sia la recidiva che la progressione sono state considerate eventi di recidiva. Se un paziente non aveva una data elencata per recidiva o progressione, la data del decesso è stata utilizzata come data dell'evento. Se il paziente non aveva recidiva, progressione o decesso, la data dell'ultimo follow-up è stata utilizzata come data di censura. I test log-rank e la regressione dei rischi proporzionali (Cox) sono stati impiegati per l'analisi della sopravvivenza e per valutare l'effetto di possibili fattori confondenti, utilizzando variabili cliniche e istopatologiche come covariate. Le variabili

che hanno influenzato significativamente la sopravvivenza nell'analisi univariata sono state incluse nei modelli multivariati. Tutte le procedure statistiche sono state eseguite utilizzando il software statistico Stata/MP 17.0 (StataCorp, College Station, TX, USA).

### Capitolo 3. Risultati

**Sezione 3.1:** *Il panorama genomico della nostra coorte di CC è eterogeneo, con basso tasso di instabilità dei microsatelliti.*

Abbiamo inizialmente testato la comparabilità della nostra coorte con quelle riportate nella letteratura analizzando i profili mutazionali e di MSI/MMR-D. Dei 113 campioni di pazienti analizzati [49 iCC (43,4%) e 64 eCC (56,6%)], 62 dei 409 geni testati (15,2%) presentavano inserzioni, delezioni o polimorfismi a singolo nucleotide. Come precedentemente riportato nei CC, abbiamo identificato mutazioni nei geni *SETD2* (n=52 di 113; 46,0%), *ARID1A* (n=14 di 113; 12,4%), *IDH1* (n=5 di 113; 4,4%) e *BAP1* (n=4 di 113; 3,5%). Abbiamo identificato mutazioni non descritte precedentemente per i CC, tra cui *TCF7L1* (n=18 di 113; 15,9%), *MAGI1* (n=14 di 113; 12,4%) e *TSC2* (n=10 di 113; 8,8%) [Tabella 2 and Figura 3].

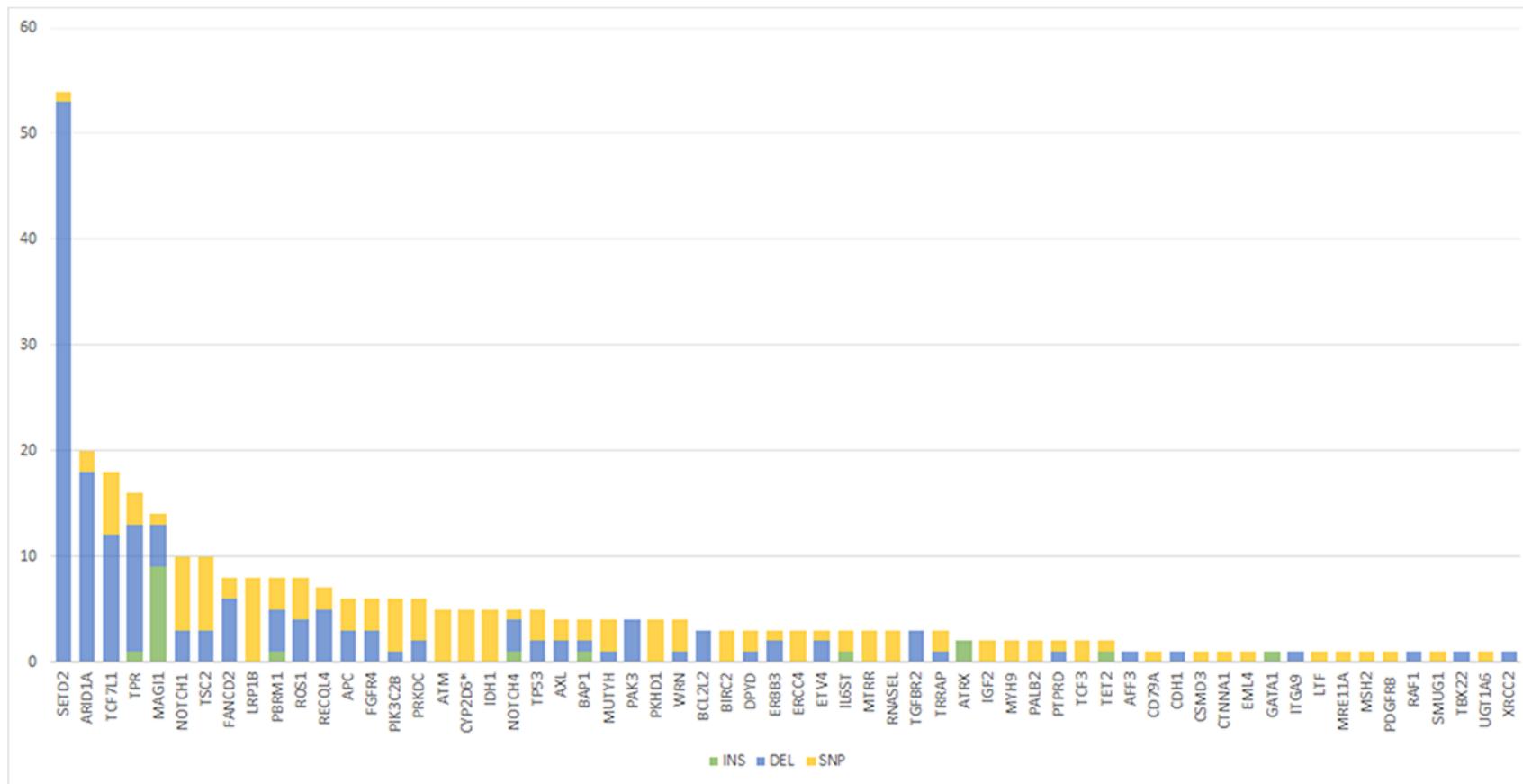
**Tabella 2. Elenco completo delle mutazioni identificate nella nostra coorte di CC stratificate in base alla sede anatomica ed eventuale letteratura di riferimento dove sono state descritte per la prima volta nel CC.** La frequenza di mutazione nei due sottogruppi è stata analizzata mediante test esatto di Fisher (p <0.005 sono evidenziati in grassetto).

| Gene           | Pazienti con mutazione (%) | iCC (n=49) |            | eCC (n=64) |            | p-value (eCC mutati vs. iCC mutati) | Reference                          |
|----------------|----------------------------|------------|------------|------------|------------|-------------------------------------|------------------------------------|
|                |                            | Mutati     | Non-mutati | Mutati     | Non-mutati |                                     |                                    |
| <i>SETD2</i>   | 52 (46.0)                  | 20         | 29         | 32         | 32         | 0.348                               | <i>Zou et al.</i> <sup>144</sup>   |
| <i>TCF7L1</i>  | 18 (15.9)                  | 6          | 43         | 12         | 52         | 0.440                               | ---                                |
| <i>TPR</i>     | 15 (13.3)                  | 6          | 43         | 9          | 55         | 1.000                               | ---                                |
| <i>ARID1A</i>  | 14 (12.4)                  | 5          | 44         | 9          | 55         | 0.580                               | <i>Jiao et al.</i> <sup>145</sup>  |
| <i>MAGI1</i>   | 14 (12.4)                  | 5          | 44         | 9          | 55         | 0.580                               | ---                                |
| <i>TSC2</i>    | 10 (8.8)                   | 3          | 46         | 7          | 57         | 0.510                               | *                                  |
| <i>NOTCH1</i>  | 9 (8.0)                    | 5          | 44         | 4          | 60         | 0.498                               | <i>Mazur et al.</i> <sup>146</sup> |
| <i>FANCD2</i>  | 8 (7.1)                    | 4          | 45         | 4          | 60         | 0.725                               | ---                                |
| <i>ROS1</i>    | 8 (7.1)                    | 3          | 46         | 5          | 59         | 1.000                               | <i>Gu et al.</i> <sup>147</sup>    |
| <i>RECQL4</i>  | 7 (6.2)                    | 1          | 48         | 6          | 58         | 0.137                               | <i>Guo et al.</i> <sup>148</sup>   |
| <i>LRP1B</i>   | 6 (5.3)                    | 3          | 46         | 3          | 61         | 1.000                               | <i>Xu et al.</i> <sup>149</sup>    |
| <i>PBRM1</i>   | 6 (5.3)                    | 1          | 48         | 5          | 59         | 0.231                               | <i>Jiao et al.</i> <sup>145</sup>  |
| <i>APC</i>     | 6 (5.3)                    | 4          | 45         | 2          | 62         | 0.400                               | <i>Kang et al.</i> <sup>150</sup>  |
| <i>FGFR4</i>   | 6 (5.3)                    | 2          | 47         | 4          | 60         | 0.696                               | <i>Xu et al.</i> <sup>151</sup>    |
| <i>PIK3C2B</i> | 6 (5.3)                    | 2          | 47         | 4          | 60         | 0.696                               | ---                                |
| <i>PRKDC</i>   | 6 (5.3)                    | 2          | 47         | 4          | 60         | 0.696                               | ---                                |
| <i>CYP2D6</i>  | 5 (4.4)                    | 1          | 48         | 4          | 60         | 0.386                               | <i>Wang et al.</i> <sup>152</sup>  |

|               |         |   |    |   |    |              |  |
|---------------|---------|---|----|---|----|--------------|--|
| <b>IDH1</b>   | 5 (4.4) | 5 | 44 | 0 | 64 | <b>0.014</b> | <i>Borger et al.</i><br>153                                |
| <b>ATM</b>    | 4 (3.5) | 2 | 47 | 2 | 62 | 1.000        | <i>Lee et al.</i> 154                                      |
| <b>NOTCH4</b> | 4 (3.5) | 3 | 46 | 1 | 63 | 0.315        | <i>Mazur et al.</i><br>146                                 |
| <b>TP53</b>   | 4 (3.5) | 2 | 47 | 2 | 62 | 1.000        | <i>Della Torre et al.</i> 155                              |
| <b>BAP1</b>   | 4 (3.5) | 4 | 45 | 0 | 64 | <b>0.033</b> | <i>Jiao et al.</i> 145                                     |
| <b>MUTYH</b>  | 4 (3.5) | 1 | 48 | 3 | 61 | 0.632        | <i>Baudhuin et al.</i> 156                                 |
| <b>PAK3</b>   | 4 (3.5) | 1 | 48 | 3 | 61 | 0.632        | ---  |
| <b>PKHD1</b>  | 4 (3.5) | 0 | 49 | 4 | 60 | 0.132        | ---  |
| <b>WRN</b>    | 4 (3.5) | 0 | 49 | 4 | 60 | 0.132        | ---  |
| <b>AXL</b>    | 4 (3.5) | 0 | 49 | 4 | 60 | 0.132        | ---  |
| <b>BCL2L2</b> | 3 (2.7) | 1 | 48 | 2 | 62 | 1.000        | ---  |
| <b>BIRC2</b>  | 3 (2.7) | 2 | 47 | 1 | 63 | 0.578        | ---  |
| <b>DPYD</b>   | 3 (2.7) | 0 | 49 | 3 | 61 | 0.257        | ---  |
| <b>ETV4</b>   | 3 (2.7) | 2 | 47 | 1 | 63 | 0.578        | <i>Singsuksawat et al.</i> 157                             |
| <b>IL6ST</b>  | 3 (2.7) | 2 | 47 | 1 | 63 | 0.578        | ---  |
| <b>MTRR</b>   | 3 (2.7) | 1 | 48 | 2 | 62 | 1.000        | ---  |
| <b>TGFBR2</b> | 3 (2.7) | 2 | 47 | 1 | 63 | 0.578        | <i>Ruzzenente et al.</i> 14                                |
| <b>TRRAP</b>  | 3 (2.7) | 2 | 47 | 1 | 63 | 0.578        | <i>Huang et al.</i><br>23                                  |
| <b>ERBB3</b>  | 2 (1.8) | 1 | 48 | 1 | 63 | 1.000        | <i>Ross et al.</i> 158                                     |
| <b>ERCC4</b>  | 2 (1.8) | 1 | 48 | 1 | 63 | 1.000        | ---  |
| <b>RNASEL</b> | 2 (1.8) | 1 | 48 | 1 | 63 | 1.000        | ---  |
| <b>ATRX</b>   | 2 (1.8) | 1 | 48 | 1 | 63 | 1.000        | ---  |
| <b>IGF2</b>   | 2 (1.8) | 0 | 49 | 2 | 62 | 0.504        | <i>Kang et al.</i> 159                                     |
| <b>MYH9</b>   | 2 (1.8) | 1 | 48 | 1 | 63 | 1.000        | ---  |
| <b>PALB2</b>  | 2 (1.8) | 2 | 47 | 0 | 64 | 0.186        | ---  |
| <b>PTPRD</b>  | 2 (1.8) | 0 | 49 | 2 | 62 | 0.504        | ---  |
| <b>TCF3</b>   | 2 (1.8) | 1 | 48 | 1 | 63 | 1.000        | ---  |
| <b>TET2</b>   | 2 (1.8) | 1 | 48 | 1 | 63 | 1.000        | ---  |
| <b>AFF3</b>   | 2 (1.8) | 1 | 48 | 1 | 63 | 1.000        | ---  |
| <b>CD79A</b>  | 1 (0.9) | 1 | 48 | 0 | 64 | 0.434        | ---  |
| <b>CDH1</b>   | 1 (0.9) | 0 | 49 | 1 | 63 | 1.000        | ---  |
| <b>CSMD3</b>  | 1 (0.9) | 0 | 49 | 1 | 63 | 1.000        | ---  |
| <b>CTNNA1</b> | 1 (0.9) | 0 | 49 | 1 | 63 | 1.000        | ---  |
| <b>EML4</b>   | 1 (0.9) | 1 | 48 | 0 | 64 | 0.434        | <i>Trombetta et al.</i> 160,<br><i>Favre et al.</i><br>161 |
| <b>GATA1</b>  | 1 (0.9) | 0 | 49 | 1 | 63 | 1.000        | <i>Xu et al.</i> 162                                       |
| <b>ITGA9</b>  | 1 (0.9) | 0 | 49 | 1 | 63 | 1.000        | ---  |
| <b>LTF</b>    | 1 (0.9) | 0 | 49 | 1 | 63 | 1.000        | ---  |
| <b>MRE11A</b> | 1 (0.9) | 0 | 49 | 1 | 63 | 1.000        | ---  |
| <b>MSH2</b>   | 1 (0.9) | 1 | 48 | 0 | 64 | 0.434        | <i>Wardell et al.</i><br>21                                |
| <b>PDGFRB</b> | 1 (0.9) | 1 | 48 | 0 | 64 | 0.434        | ---  |

|               |         |   |    |   |    |       |                                  |
|---------------|---------|---|----|---|----|-------|----------------------------------|
| <b>RAF1</b>   | 1 (0.9) | 1 | 48 | 0 | 64 | 0.434 | <i>Lee et al.</i> <sup>154</sup> |
| <b>SMUG1</b>  | 1 (0.9) | 1 | 48 | 0 | 64 | 0.434 | ---                              |
| <b>TBX22</b>  | 1 (0.9) | 1 | 48 | 0 | 64 | 0.434 | ---                              |
| <b>UGT1A6</b> | 1 (0.9) | 1 | 48 | 0 | 64 | 0.434 | ---                              |
| <b>XRCC2</b>  | 1 (0.9) | 0 | 49 | 1 | 63 | 1.000 | ---                              |

\*: delezione eterozigote genomica di TSC2 è stata riportata in un caso di epatocarcinoma-colangiocarcinoma combinato da *Su et al.*<sup>163</sup>



**Figura 3. Profilo Mutazionale.** Grafico a barre impilate che rappresenta la quantità relativa di inserzioni (INS), delezioni (DEL) e polimorfismi a singolo nucleotide (SNP) per ciascuna mutazione negli esoni (rappresentata con un colore diverso, come descritto nella legenda). L'asse X riporta l'elenco dei geni, mentre l'asse Y indica la percentuale di casi che presentano la specifica mutazione.

Le mutazioni nei geni *SETD2* e *TCF7L1* si sono verificate insieme (“clustering mutations”) in 13 pazienti, che tuttavia non differivano per caratteristiche clinico-patologiche dagli altri pazienti. Le mutazioni di *IDH1* e *BAP1* erano significativamente correlate e osservate solo nell’iCC (p=0,014 e p=0,033, rispettivamente). Nessuna mutazione genica è risultata correlata al sottogruppo di pazienti con eCC.

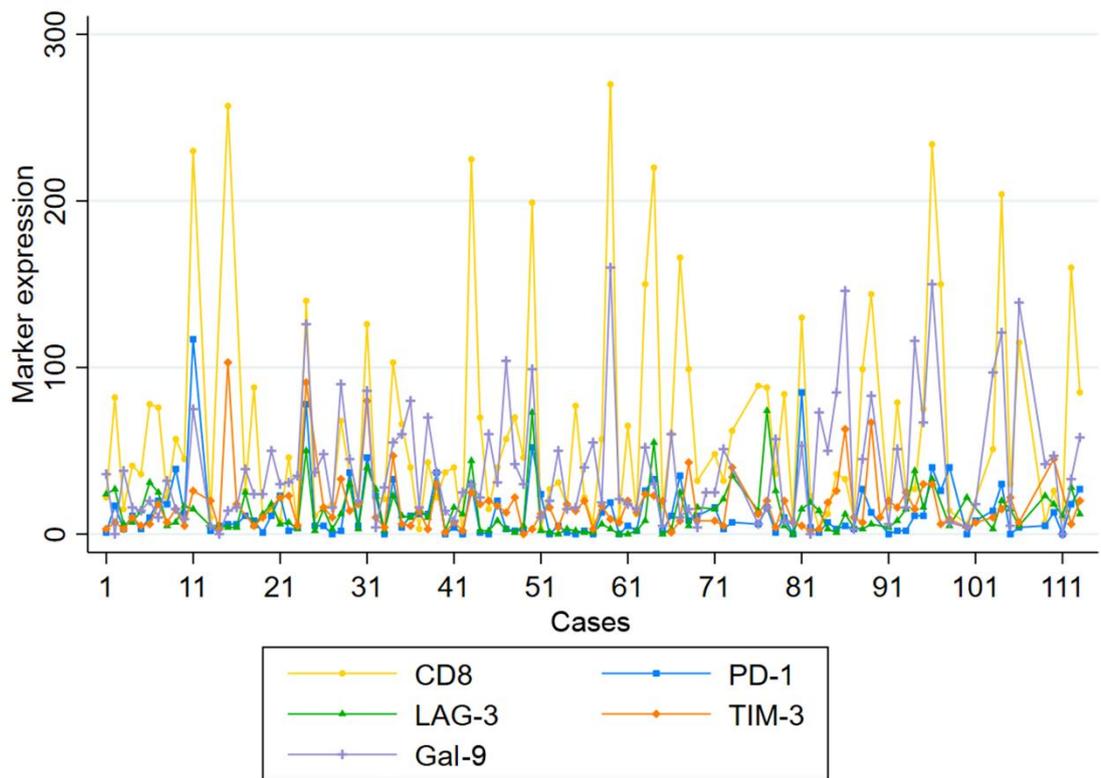
Sulla base dei dati di letteratura, circa il 5-10% dei pazienti con CC presenta MSI/MMR-D e profili mutazionali eterogenei. Anche nella nostra coorte abbiamo riscontrato profili mutazionali eterogenei e bassi tassi di MSI/MMR-D. La valutazione dell’espressione proteica di MLH-1, PMS-2, MSH-6 e MSH-2 nei nuclei delle cellule tumorali dei CC ha rivelato una bassa prevalenza di MSI/MMR-D (n=7 su 104; 6,7%). La perdita di espressione nelle cellule tumorali è stata osservata sia per MLH-1 che PMS-2 (n=5), sia per MSH-6 che MSH-2 (n=1) e solo per MSH-6 (n=1). L’età avanzata alla chirurgia era l’unica caratteristica clinico-patologica che differiva significativamente tra il sottogruppo MSI/MMR-D [età mediana alla chirurgia: 76 anni; intervallo interquartile (IQR): 68-83] e il sottogruppo MSS/MMR-I (età mediana alla chirurgia: 66 anni, IQR: 59-73; p=0,014).

### ***Sezione 3.2: Espressione di multipli checkpoint immunitari nei TILs e di Galectina-9 nelle cellule tumorali***

*Linfociti tumorali infiltranti (TILs):* Abbiamo valutato la densità dei TIL [linfociti all’interno dell’area tumorale e del microambiente immunitario peritumorale (TP-IM) descritta in precedenza] che esprimevano un dato marcatore tramite immunocolorazione singola. Da quella più alta a quella più bassa, le densità mediane (cellule positive/mm<sup>2</sup>) erano: CD8-TILs=59,5 (IQR:29,6-146,4); Gal-9-TILs=55,2 (IQR:10,3-222,6); LAG3-TILs=26,2 (IQR:8,5-73,2); TIM3-TILs=20,5 (IQR:7,3-70,1); PD-1-TILs=12,9 (IQR:2,3-31,7); e MHCII-TILs=4,7 (IQR:1,3-39,9).

*Potenziale presentazione dell’antigene tra cellule tumorali e TILs:* Abbiamo esaminato l’espressione di MHCI e MHCII nelle cellule tumorali dei CC. In condizioni non neoplastiche, i colangiociti esprimono la proteina MHCI, mentre l’espressione di MHCII è minima o negativa, ma viene indotta in un microambiente ricco di IFN- $\gamma$ . Le cellule dei CC erano positive per MHCI nel 94,0% dei campioni (MHCI-TCs-Positive; n=63/67) e positive

per MHCII nel 33,0% dei campioni (MHCII-TCs-Positive; n=34/103). Non sono state trovate differenze significative nella densità di nessun marcatore dei TILs quando si confrontavano i sottogruppi MHCII-TCs-Positive e MHCII-TCs-Negative. Tuttavia, il sottogruppo MHCII-TCs-Positive aveva un aumento di LAG3-TILs (mediana:75,4, IQR:22,3-112,0, p=0,003), PD-1-TILs (mediana:26,4, IQR:7,8-44,8, p=0,012), e MHCII-TILs (mediana:22,6, IQR:3,3-89,8, p<0,001) rispetto al sottogruppo MHCII-TCs-Negative. I CC che mostrano espressione di MHCII sono quindi più frequentemente infiltrati da linfociti



con un fenotipo da esaurimento (LAG3+ e/o PD-1) [Figura 4].

**Figura 4. Profilo Immunitario dei TILs valutato con IHC.** I marcatori sono riportati come valore medio di espressione (asse Y) per ciascun caso (asse X) e rappresentati con un colore diverso, come descritto nella legenda della figura.

*Modulazione immunitaria da parte delle cellule tumorali:* L'esaurimento dei linfociti T è regolato dall'espressione di recettori inibitori di superficie, come PD-1, LAG3 e TIM3, e dalla loro interazione con i rispettivi ligandi (PD-L1, MHCII e Gal-9). Abbiamo valutato l'espressione proteica di Gal-9, LAG3 e PD-L1 sulle cellule tumorali dei CC e correlato questi dati con le popolazioni di TILs con fenotipi corrispondenti.

Nella letteratura scientifica, l'espressione di Gal-9 da parte delle cellule tumorali è stata principalmente associata alla progressione della malattia e a una peggiore sopravvivenza dei pazienti a causa dell'interazione di Gal-9 con TIM3 e del conseguente esaurimento delle cellule T nel TP-IM. Tuttavia, è interessante notare che i pazienti con adenocarcinoma pancreatico hanno mostrato una prognosi migliore se le cellule tumorali esprimevano Gal-9. Sulla base di questi risultati e considerazioni, abbiamo valutato l'espressione proteica di Gal-9 nelle cellule tumorali di CC utilizzando un sistema a tre livelli: (1) espressione di Gal-9 in <1% delle cellule tumorali (n=10/103, 9,7%) o "Gal-9-TCs-Negative"; (2) espressione di Gal-9 in 1-50% delle cellule tumorali (n=36/103, 35,0%) o "Gal-9-TCs-Low"; (3) espressione di Gal-9 in >50% delle cellule tumorali (n=57/103, 55,3%) o "Gal-9-TCs-High". Inoltre, è stato osservato un aumento dei Gal-9-TILs/mm<sup>2</sup> nei campioni con Gal-9-TCs-High (mediana: 173,3, IQR: 28,4-341,0) rispetto ai sottogruppi Gal-9-TCs-Low (mediana: 46,0, IQR: 9,8-75,5; p=0,003) e Gal-9-TCs-Negative (mediana: 2,3, IQR: 1,0-6,9; p<0,001). Analogamente, i campioni Gal-9-TCs-Low hanno presentato un aumento dei Gal-9-TILs/mm<sup>2</sup> rispetto al sottogruppo Gal-9-TCs-Negative (p=0,032). Tuttavia, la densità di TIM3-TILs non differiva significativamente in base alla classificazione Gal-9-TCs (p=0,097 per Gal-9-TCs-High vs. Gal-9-TCs-Low; p=0,272 per Gal-9-TCs-High vs. Gal-9-TCs-Negative; p=0,492 per Gal-9-TCs-Low vs. Gal-9-TCs-Negative). Questo risultato è in contrasto con altri contesti tumorali neoplastici.

Durante la quantificazione dell'espressione dei TIL LAG3, è stato notato che era presente un'abbondante colorazione delle cellule tumorali; pertanto, abbiamo valutato anche l'espressione di LAG3 nelle cellule tumorali. Le cellule tumorali sono risultate positive per l'espressione della proteina LAG3 nel 71,6% (n=73/102) dei casi di CC. Le correlazioni tra LAG3-TCs e sottotipi di TILs hanno rivelato solo un aumento dei LAG3-TILs/mm<sup>2</sup>

(mediana: 25,6, IQR: 7,8-76,9;  $p=0,011$ ) nel sottogruppo LAG3-TCs-Positive rispetto al sottogruppo LAG3-TCs-Negative (mediana: 19,6, IQR: 5,5-42,4). Come riportato in altri contesti tumorali, l'espressione di LAG3 nelle cellule tumorali potrebbe essere indicativa della risposta agli ICI (inibitori di checkpoint immunitario) e merita ulteriori caratterizzazioni nel CC.

*Espressione di PD-L1 nelle cellule tumorali:* In assenza di un sistema di scoring standardizzato per PD-L1 nei CC, abbiamo valutato sia il punteggio di proporzione tumorale (PD-L1-TPS), che considera solo le cellule tumorali, sia il punteggio combinato positivo (PD-L1-CPS), che considera l'espressione sia delle cellule tumorali sia delle cellule immunitarie. I valori soglia per PD-L1-TPS (PD-L1-TPS-0: PD-L1-TPS <1%; PD-L1-TPS-1: PD-L1-TPS 1–49%; e PD-L1-TPS-2: PD-L1-TPS  $\geq$ 50%) sono stati proposti in altri contesti tumorali per identificare i pazienti che potrebbero beneficiare delle terapie con ICI (inibitori di checkpoint immunitario). Campioni di 85 pazienti (83,33%) erano PD-L1-TPS-0, mentre 17 pazienti (16,67%) esprimevano PD-L1, stratificati come PD-L1-TPS-1 ( $n=15$ , 14,71%) e PD-L1-TPS-2 ( $n=2$ , 1,96%). Clinicamente, i CC PD-L1+ (TPS-1 o -2) presentavano tassi più elevati di colangite sclerosante primitiva (PSC;  $n=4$  su 17, 23,5%;  $p=0,017$ ) e stadio pN1 ( $n=13$  su 15, 86,7%;  $p=0,002$ ) rispetto al sottogruppo PD-L1-TPS-0 (PSC:  $n=4$  su 84, 4,8%; pN1:  $n=25$  su 63, 39,7%).

Abbiamo valutato il PD-L1-CPS utilizzando i valori soglia pubblicati (PD-L1-CPS-0: PD-L1-CPS <1; PD-L1-CPS-1: PD-L1-CPS 1–10; PD-L1-CPS-2: PD-L1-CPS  $\geq$ 10). Analogamente al PD-L1-TPS, l'80,4% dei campioni è risultato PD-L1-CPS-0 ( $n=82$  su 102) e ha mostrato associazioni significative simili con PSC e stadio pN1.

Successivamente, abbiamo effettuato confronti a coppie tra PD-L1-TPS e i fenotipi quantitativi di TILs/mm<sup>2</sup>. È stato osservato un aumento di CD8-TILs/mm<sup>2</sup> nei sottogruppi PD-L1-TPS-2 (mediana: 335,3, IQR: 171,0-499,5;  $p=0,019$ ) e PD-L1-TPS-1 (mediana: 146,4, IQR: 60,8-182,1;  $p=0,011$ ) rispetto al sottogruppo PD-L1-TPS-0 (mediana: 51,0, IQR: 24,4-117,2), ma non sono state osservate interazioni significative aggiuntive confrontando i campioni di CC dei pazienti PD-L1+ rispetto ai pazienti negativi. Risultati simili sono stati osservati analizzando il PD-L1-CPS. Questi dati sono difficili da conciliare con la letteratura

attuale, data la mancanza di sistemi di scoring standardizzati nei CC. Tuttavia, sembra che i tumori CC con maggiore espressione di PD-L1 non mostrino differenze significative nel TP-IM e, pertanto, il PD-L1 potrebbe non rappresentare il miglior biomarcatore per guidare le strategie immunoterapeutiche nei pazienti con CC.

*Fenotipo complessivo delle cellule tumorali:* Abbiamo valutato la correlazione tra MHCI-TCs, MHCII-TCs, LAG3-TCs e Gal-9-TCs. Solo il confronto tra MHCII-TCs e Gal-9-TCs ha rivelato un'associazione significativa ( $p=0,038$ ). Non sono state osservate associazioni significative tra l'espressione di PD-L1 (considerando sia il sistema TPS che CPS) e l'espressione di MHCI-TCs, MHCII-TCs, LAG3-TCs e Gal-9-TCs.

**Sezione 3.3:** *Rare correlazioni sono emerse emergono tra il profilo molecolare e proteomico/immunoistochimico*

Studi recenti hanno definito sottotipi di CC basati su firme genomiche, trascrittomiche e proteomiche del microambiente immunitario peritumorale, alcune delle quali hanno potenziale terapeutico. Pertanto, abbiamo valutato possibili interazioni tra il profilo genomico e il microambiente immunitario del CC.

In primo luogo, abbiamo osservato che né la presenza né l'accumulo di mutazioni hanno avuto un impatto significativo su: (1) la densità di CD8-TILs, MHCII-TILs, LAG3-TILs, TIM3-TILs, PD-1-TILs e Gal-9-TILs; (2) l'espressione di PD-L1-TPS e PD-L1-CPS; o (3) i fenotipi delle cellule tumorali di CC (es. espressione di MHCI-TCs, MHCII-TCs, LAG3-TCs e Gal-9-TCs). Quando ogni mutazione è stata valutata singolarmente, sono state identificate associazioni significative con i profili di espressione proteica dei TILs e delle cellule tumorali di CC, ma la rilevanza clinica di questi risultati è limitata dal piccolo numero di campioni di pazienti con una determinata mutazione. È degno di nota che la mutazione di *WRN* (un gene cruciale per la stabilità del genoma) è stata associata a MHCII-TCs-Positive ( $p=0,034$ ).

In secondo luogo, abbiamo osservato che nei 13 pazienti con CC con mutazioni raggruppate di *SETD2* e *TCF7L1* vi era una maggiore densità di PD-1-TILs (mediana: 40,3, IQR: 7,8-57,9;  $p=0,043$ ) e di MHCII-TILs (mediana: 41,2, IQR: 4,6-90,4;  $p=0,032$ ) rispetto agli altri pazienti (PD-1-TILs - mediana: 10,3, IQR: 2,0-29,6; MHCII-TILs - mediana: 3,2, IQR:

1,3-32,4). Inoltre, questi pazienti con CC avevano una prevalenza più alta di campioni LAG3-TCs-Positive (n=11 su 11, 100%; p=0,031) rispetto agli altri pazienti (n=62 su 91, 68,1%). Non sono state osservate altre differenze significative.

Infine, abbiamo confrontato le popolazioni MSI/MMR-D (n=7 su 104) e MSS/MMR-I (n=97 su 104). Il sottogruppo MSS/MMR-I aveva una densità maggiore di CD8-TILs (mediana: 182,1, IQR: 50,9-394,7; p=0,049) e una maggiore prevalenza di campioni LAG3-TCs-Positive (n=70 su 94, 74,5%; p=0,020) rispetto al sottogruppo MSI/MMR-D (CD8-TILs - mediana: 57,0, IQR: 26,0-143,0; campioni LAG3-TCs-Positive - n=2 su 7, 28,6%). Non sono state osservate altre differenze significative tra le popolazioni MSI/MMR-D e MSS/MMR-I.

Complessivamente, questi dati suggeriscono che il profilo genomico e lo stato MSI/MMR-D sono marginalmente correlati con i marcatori del microambiente immunitario e potrebbero non essere informativi nel prevedere la risposta del CC alle terapie con ICI.

#### **Sezione 3.4:** *Galectina-9 come fattore di rischio indipendente per OS e RFS*

Applicando le caratteristiche dei campioni di CC descritte sopra, abbiamo valutato l'impatto sulla recidiva della malattia e sulla sopravvivenza dei pazienti. Il follow-up mediano della nostra coorte è stato di 14 mesi (IQR: 0-66). La sopravvivenza libera da recidiva (RFS) e la sopravvivenza globale (OS) mediane sono state rispettivamente di 12 mesi (IQR: 1-112) e 16 mesi (IQR: 1-112). La RFS e la OS a 5 anni sono state rispettivamente del 23,4% (IC 95%: 12-37) e del 22,5% (IC 95%: 11-36).

Coerentemente con studi precedenti, l'analisi univariata delle variabili cliniche ha mostrato che sia la RFS sia la OS erano significativamente influenzate dal coinvolgimento linfonodale (OS - HR: 3,052, IC 95%: 1,724-5,401; p<0,001; RFS - HR: 3,067, IC 95%: 1,463-6,426; p=0,003) e dai margini di resezione chirurgica (OS - HR: 2,131, IC 95%: 1,279-3,550; p=0,004; RFS - HR: 2,093, IC 95%: 1,117-3,924; p=0,021) [Figura 5].

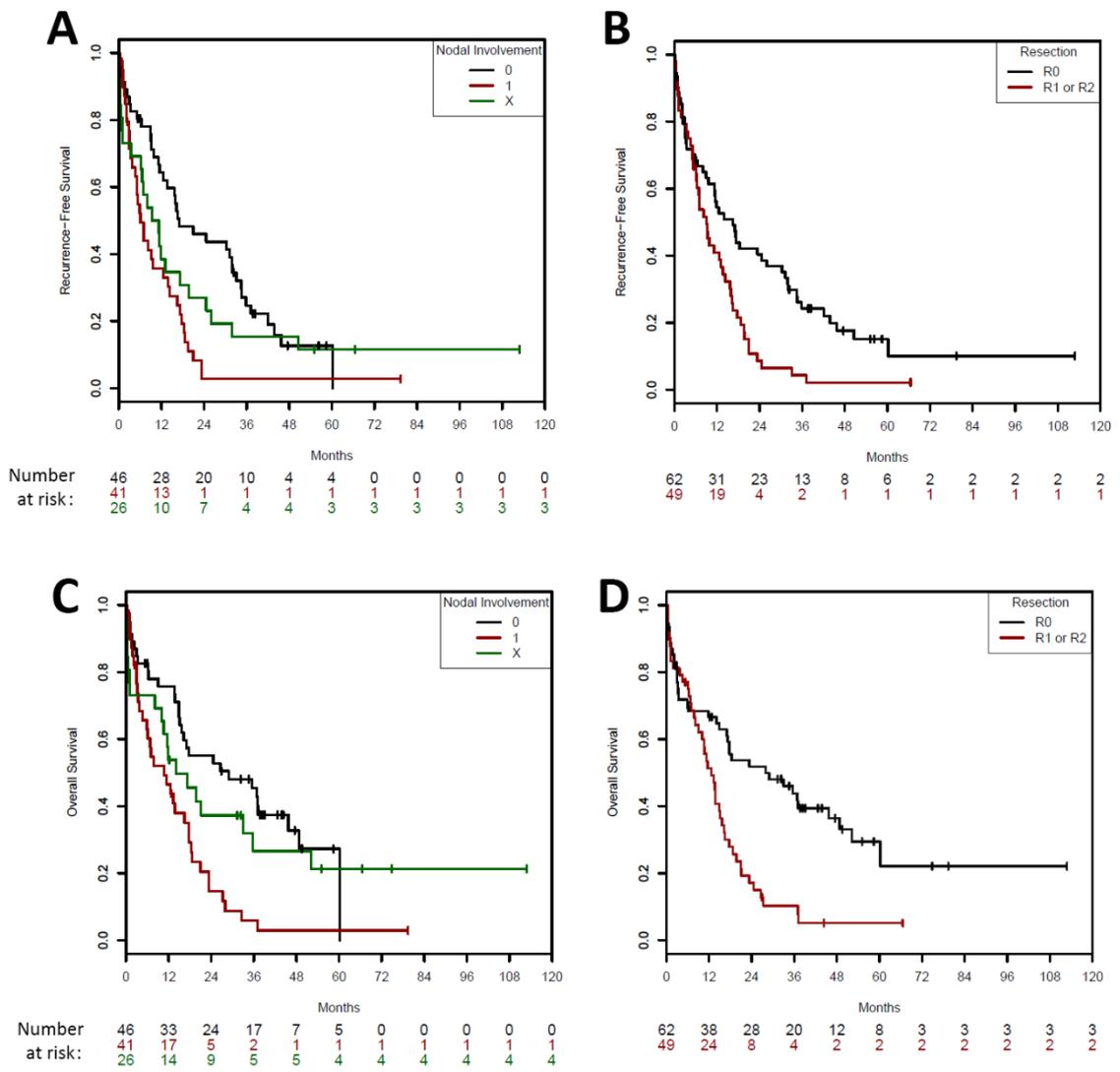


Figura 5. Curve di sopravvivenza riguardanti il RFS (A-B) e OS (C-D) per l'invasione linfonodale (A, C) e i margini di resezione (B, D).

I marcatori associati in modo significativo (tramite test log-rank) con la OS sono stati un'alta presenza di Gal-9-TCs (sopravvivenza migliorata,  $p < 0,001$ ), un alto PD-L1-TPS (sopravvivenza ridotta,  $p = 0,027$ ) e un'alta presenza di MHCII-TCs (sopravvivenza ridotta,  $p < 0,001$ ). I pazienti con Gal-9-TCs-HIGH hanno mostrato una OS migliorata (HR: 0,229, IC 95%: 0,103-0,508;  $p < 0,001$ ). Al contrario, i pazienti con PD-L1-TPS-1 (HR: 2,138, IC 95%: 1,088-4,202;  $p = 0,027$ ), PD-L1-TPS-2 (HR: 3,113, IC 95%: 0,734-13,195;  $p = 0,123$ ) e MHCII-TCs-Positive (HR: 2,382, IC 95%: 1,413-4,015;  $p < 0,001$ ) hanno mostrato una OS peggiore. Gal-9-TCs-HIGH è stato l'unico biomarcatore che si è dimostrato un predittore indipendente di OS nel modello multivariato (HR: 0,325; IC 95%: 0,124-0,854;  $p = 0,023$ ).

Solo PD-L1-TPS ha mostrato un impatto significativo sulla RFS ( $p < 0,001$ ; test log-rank). PD-L1-TPS è stato l'unico biomarcatore associato alla RFS (test log-rank,  $p < 0,001$ ) e i pazienti con PD-L1-TPS-2 hanno mostrato una RFS peggiore sia nell'analisi univariata (HR: 25,079, IC 95%: 4,952-127,012;  $p < 0,001$ ) sia in quella multivariata (HR: 27,812, IC 95%: 3,521-219,680;  $p = 0,002$ ).

### **Sezione 3.5:** *L'espressione della Galectina-9 identifica una nicchia di CC caratterizzati da alti livelli di TDO2*

Considerando che (1) l'espressione di Gal-9 nelle cellule tumorali di CC può identificare pazienti con una migliore OS e (2) l'espressione di Gal-9 non era correlata ai TIM3-TILs o ad altre caratteristiche clinico-patologiche eccetto la PSC ( $p = 0,014$ ), abbiamo esplorato percorsi alternativi nella biologia tumorale o nel microambiente immunitario per comprendere meglio le potenziali terapie mirate per i casi Gal-9-TCs-Low.

In un sottogruppo di 28 pazienti, Gal-9-TCs-High ( $n = 13$ ) e Gal-9-TCs-Low ( $n = 15$ ), sono stati identificati 38 geni espressi in modo differenziale tra i gruppi, ma dopo l'aggiustamento per confronti multipli, solo l'espressione dell'mRNA di collagen type XI alpha 2 chain (*COL11A2*) e di *TDO2* ha mostrato differenze significative. I campioni Gal-9-TCs-High hanno mostrato un'espressione più alta di mRNA di *COL11A2* rispetto ai campioni Gal-9-TCs-Low [Log2 Fold change: 3,43;  $p$  aggiustato = 0,003]. *COL11A2* è coinvolto nel rimodellamento della matrice ma non è stato precedentemente associato al CC. *TDO2*, che codifica un enzima coinvolto nel catabolismo del triptofano, è stato espresso a livelli

inferiori [Log2 Fold change: -1,40; p aggiustato=0,034] nei campioni Gal-9-TCs-High rispetto ai Gal-9-TCs-Low.

Poiché i livelli di espressione di mRNA di *TDO2* potrebbero essere influenzati dalla sua regolazione fisiologica da parte degli epatociti, abbiamo valutato l'espressione proteica di *TDO2* nelle cellule tumorali di CC tramite IHC (TDO2-TCs). L'associazione tra Gal-9-TCs e l'espressione di mRNA di *TDO2* è stata confermata tramite IHC ( $p < 0,001$ ). Proporzionalmente, i campioni Gal-9-TCs-High che erano negativi per l'espressione della proteina *TDO2* (TDO2-TCs-Negative; n=31 su 44; 70,4%) erano in percentuale più alta rispetto ai Gal-9-TCs-Low (n=2 su 24; 14,3%) e ai Gal-9-TCs-Negative (n=1 su 5; 20%).

Considerando il ruolo di *TDO2* e del catabolismo del triptofano nella soppressione della risposta immunitaria, ipotizziamo che la regolazione immunitaria mediata dalle cellule tumorali di CC, attraverso Gal-9, non sia basata sull'interazione TIM3/Gal-9. La regolazione dei livelli di triptofano nel microambiente immunitario peritumorale dovrebbe essere presa in considerazione. Queste osservazioni supportano il targeting del catabolismo del triptofano come strategia terapeutica per i casi Gal-9-TCs-Low.

## Capitolo 4. Discussione

Questa coorte di pazienti con CC ha presentato un profilo clinico-patologico, mutazionale e MSI/MMR-D simile a quelli precedentemente descritti in letteratura, confermando l'adeguatezza e la comparabilità della nostra serie<sup>14,18,27,28,164,18,62,63,164,165</sup>. Studi di profilazione genomica del CC hanno rivelato un panorama mutazionale eterogeneo e fornito una categorizzazione basata su approcci multi-omici<sup>62,63,165</sup>. L'identificazione di sottogruppi di pazienti, basata su raggruppamenti genomici e MSI/MMR-D, non ha prodotto dati prognostici sostanziali nel nostro studio. Basandoci sulla nostra conoscenza della distruzione immunomediata dei colangiociti nelle colangiopatie croniche non neoplastiche, ci siamo concentrati principalmente su: (1) determinare il fenotipo delle cellule tumorali e immunitarie del CC; (2) determinare se alcune caratteristiche fenotipiche avessero un impatto significativo sulla sopravvivenza dei pazienti; e (3) stabilire se alcune delle caratteristiche fenotipiche potessero essere bersaglio di trattamenti personalizzati.

Nei CC, i nostri risultati innovativi includono l'identificazione di due paradossi legati alla sopravvivenza dei pazienti, che contraddicono ciò che si sa sulla distruzione dei colangiociti in condizioni non neoplastiche. Il primo paradosso è che l'elevata espressione di MHCII nelle cellule tumorali del CC è associata a un peggioramento della sopravvivenza globale. Nelle colangiopatie croniche necro-infiammatorie immunomediate e in vitro, l'espressione di MHCII indotta da IFN- $\gamma$  nei colangiociti porta all'acquisizione di capacità di presentazione dell'antigene e si potrebbe prevedere che migliori il riconoscimento delle cellule tumorali da parte del sistema immunitario<sup>35,65,81,82,103</sup>. Nella nostra coorte, l'espressione di MHCII nelle cellule tumorali del CC è stata identificata in un sottogruppo di casi che mostrava un aumento della densità di TIL esprimenti marker di checkpoint immunitario e di esaurimento (PD-1 e LAG3). In modo coerente con quanto osservato nel cancro del polmone e nel melanoma, l'espressione di MHCII nelle cellule tumorali è associata a un fenotipo di TIL esauriti particolarmente arricchito di PD-1 e LAG3, con una prognosi peggiore. Pertanto, gli ICI specifici per PD-1 e LAG3 potrebbero essere efficaci in questo sottogruppo di pazienti, inibendo il fenotipo di esaurimento e riattivando i TILs, e permettendo al sistema immunitario di bersagliare in modo più efficace le cellule

tumorali che esprimono MHCII<sup>88</sup>. Ipotesi simili sono state proposte negli studi sul melanoma<sup>166</sup> e sul linfoma di Hodgkin classico<sup>167</sup>.

Il secondo paradosso è che l'elevata espressione di Gal-9 nelle cellule tumorali è associata a una migliore sopravvivenza globale. Gal-9 è riconosciuto principalmente come un ligando di TIM3 sulla membrana dei TIL, che porta all'esaurimento dei linfociti T e alla soppressione della risposta immunitaria, associata a una prognosi sfavorevole in vari tipi di tumori<sup>119,168</sup>. Tuttavia, Gal-9 può indurre aggregazione e apoptosi delle cellule tumorali attraverso un percorso indipendente dall'interazione con TIM3<sup>169</sup>. L'associazione tra elevata espressione di Gal-9 e miglior sopravvivenza nel CC, simile a quanto osservato nei carcinomi pancreatici<sup>170</sup>, potrebbe rappresentare un meccanismo di fuga immunitaria noto come "risposta immunitaria attiva" o "resistenza immunitaria adattativa"<sup>170</sup>. L'inversa correlazione tra l'espressione di Gal-9 e quella di TDO2 nella nostra coorte supporta l'ipotesi che la resistenza immunitaria adattativa possa essere correlata alla disponibilità di triptofano. Nei dendritici (o in altre APC), TDO2 e IDO catabolizzano il triptofano, influenzando la concentrazione disponibile per i linfociti<sup>101</sup>. I nostri risultati suggeriscono che l'effetto immunomodulante del catabolismo del triptofano potrebbe meritare un'analisi più dettagliata nel contesto dei CC<sup>171</sup>.

L'uso di PD-L1 come marcatore predittivo per identificare i pazienti responsivi agli ICI rimane infruttuoso per i pazienti con CC<sup>34</sup>. Questo può essere parzialmente spiegato dalla mancanza di metodi di valutazione consensuali per l'espressione di PD-L1 nel CC, che porta a una vasta gamma di casi positivi riportati (10-70%) tra gli studi<sup>34</sup>. In questo scenario, trarre conclusioni sul ruolo di PD-L1 nella gestione terapeutica dei pazienti con CC è complesso e dibattuto. È necessario un consenso tra i ricercatori in questo campo.

## **Capitolo 5. Limitazioni e Prospettive Future**

Le nuove correlazioni osservate nel nostro studio non hanno stabilito una relazione causale, limitando così l'impatto dei nostri risultati. Per affrontare questa limitazione, è necessario l'uso di modelli preclinici specifici per il CC. Inoltre, una risposta immunitaria efficace contro le cellule tumorali richiede l'attivazione multistep e l'attività sinergica di molecole costimolatorie, come B7-1 (CD80) e B7-2 (CD86) per la risposta immunitaria mediata da MHCII, il che richiede ulteriori indagini nel contesto del microambiente immunitario del CC. Infine, mentre il nostro studio si è concentrato sul meccanismo di danno diretto dei colangiociti mediato dal sistema immunitario, è necessaria un'analisi estesa della densità capillare. Nelle colangiopatie non neoplastiche, i linfociti che prendono di mira il plesso capillare peribiliare rappresentano un meccanismo rilevante di danno indiretto dei dotti biliari che dovrebbe essere considerato nel contesto del CC insieme ai nostri risultati.

## Capitolo 6. Conclusione

Confrontando la distruzione immunomediata dei colangiociti nelle malattie non neoplastiche con il CC, abbiamo identificato due biomarcatori promettenti per la stratificazione dei pazienti con CC: (1) l'espressione proteica di MHCII, che potrebbe servire come nuovo bersaglio per attivare la risposta del sistema immunitario e anche come marcatore predittivo per il trattamento con ICI; e (2) l'espressione proteica di Gal-9, che è emersa come indicatore prognostico per i pazienti con CC e potrebbe essere correlata alla regolazione del catabolismo del triptofano. Il nostro studio sottolinea la necessità di un'analisi più dettagliata dei meccanismi di distruzione immunomediata dei colangiociti all'interno del microambiente immunitario del CC. Tali indagini potrebbero fornire preziose informazioni sui meccanismi alla base della fuga immunitaria nel CC, consentendo una migliore stratificazione dei pazienti per trattamenti personalizzati e identificando nuovi bersagli terapeutici.

## Capitolo 7. Bibliografia

### References

1. Khan, S.A., Tavolari, S. & Brandi, G. Cholangiocarcinoma: Epidemiology and risk factors. *Liver Int* **39 Suppl 1**, 19-31 (2019).
2. Gad, M.M., *et al.* Epidemiology of Cholangiocarcinoma; United States Incidence and Mortality Trends. *Clin Res Hepatol Gastroenterol* **44**, 885-893 (2020).
3. Brindley, P.J., *et al.* Cholangiocarcinoma. *Nat Rev Dis Primers* **7**, 65 (2021).
4. Banales, J.M., *et al.* Cholangiocarcinoma 2020: the next horizon in mechanisms and management. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol* **17**, 557-588 (2020).
5. Marin, J.J.G., *et al.* Current and novel therapeutic opportunities for systemic therapy in biliary cancer. *Br J Cancer* **123**, 1047-1059 (2020).
6. Yoo, C., *et al.* Current Status and Future Perspectives of Perioperative Therapy for Resectable Biliary Tract Cancer: A Multidisciplinary Review. *Cancers (Basel)* **13**(2021).
7. Bertuccio, P., *et al.* A comparison of trends in mortality from primary liver cancer and intrahepatic cholangiocarcinoma in Europe. *Ann Oncol* **24**, 1667-1674 (2013).
8. Vithayathil, M. & Khan, S.A. Current epidemiology of cholangiocarcinoma in Western countries. *J Hepatol* **77**, 1690-1698 (2022).
9. Pascale, A., Rosmorduc, O. & Duclos-Vallee, J.C. New epidemiologic trends in cholangiocarcinoma. *Clin Res Hepatol Gastroenterol* **47**, 102223 (2023).
10. Selvadurai, S., *et al.* Cholangiocarcinoma miscoding in hepatobiliary centres. *Eur J Surg Oncol* **47**, 635-639 (2021).
11. ICD-11 for Mortality and Morbidity Statistics (2021).
12. Banales, J.M., *et al.* Expert consensus document: Cholangiocarcinoma: current knowledge and future perspectives consensus statement from the European Network for the Study of Cholangiocarcinoma (ENS-CCA). *Nat Rev Gastroenterol Hepatol* **13**, 261-280 (2016).
13. Andersen, J.B., *et al.* Genomic and genetic characterization of cholangiocarcinoma identifies therapeutic targets for tyrosine kinase inhibitors. *Gastroenterology* **142**, 1021-1031 e1015 (2012).
14. Ruzzenente, A., *et al.* Cholangiocarcinoma Heterogeneity Revealed by Multigene Mutational Profiling: Clinical and Prognostic Relevance in Surgically Resected Patients. *Ann Surg Oncol* **23**, 1699-1707 (2016).
15. Jusakul, A., *et al.* Whole-Genome and Epigenomic Landscapes of Etiologically Distinct Subtypes of Cholangiocarcinoma. *Cancer Discov* **7**, 1116-1135 (2017).
16. Lowery, M.A., *et al.* Comprehensive Molecular Profiling of Intrahepatic and Extrahepatic Cholangiocarcinomas: Potential Targets for Intervention. *Clin Cancer Res* **24**, 4154-4161 (2018).
17. Kendall, T., *et al.* Anatomical, histomorphological and molecular classification of cholangiocarcinoma. *Liver Int* **39 Suppl 1**, 7-18 (2019).
18. Weinberg, B.A., *et al.* Molecular profiling of biliary cancers reveals distinct molecular alterations and potential therapeutic targets. *J Gastrointest Oncol* **10**, 652-662 (2019).
19. Louis, C., Papoutsoglou, P. & Coulouarn, C. Molecular classification of cholangiocarcinoma. *Curr Opin Gastroenterol* **36**, 57-62 (2020).
20. Simbolo, M., *et al.* Multigene mutational profiling of cholangiocarcinomas identifies actionable molecular subgroups. *Oncotarget* **5**, 2839-2852 (2014).
21. Wardell, C.P., *et al.* Genomic characterization of biliary tract cancers identifies driver genes and predisposing mutations. *J Hepatol* **68**, 959-969 (2018).
22. Al-Rajabi, R. & Sun, W. Immunotherapy in cholangiocarcinoma. *Curr Opin Gastroenterol* **37**, 105-111 (2021).

23. Huang, X., Tang, T., Zhang, G. & Liang, T. Identification of tumor antigens and immune subtypes of cholangiocarcinoma for mRNA vaccine development. *Mol Cancer* **20**, 50 (2021).
24. Carapeto, F., *et al.* The Immunogenomic Landscape of Resected Intrahepatic Cholangiocarcinoma. *Hepatology* (2021).
25. Silva, V.W., *et al.* Biliary carcinomas: pathology and the role of DNA mismatch repair deficiency. *Chin Clin Oncol* **5**, 62 (2016).
26. Saeed, A., Park, R., Al-Jumayli, M., Al-Rajabi, R. & Sun, W. Biologics, Immunotherapy, and Future Directions in the Treatment of Advanced Cholangiocarcinoma. *Clin Colorectal Cancer* **18**, 81-90 (2019).
27. Goepfert, B., *et al.* Mismatch repair deficiency is a rare but putative therapeutically relevant finding in non-liver fluke associated cholangiocarcinoma. *Br J Cancer* **120**, 109-114 (2019).
28. Ju, J.Y., *et al.* Mismatch Repair Protein Deficiency/Microsatellite Instability Is Rare in Cholangiocarcinomas and Associated With Distinctive Morphologies. *Am J Clin Pathol* **153**, 598-604 (2020).
29. Ma, W., Pham, B. & Li, T. Cancer neoantigens as potential targets for immunotherapy. *Clin Exp Metastasis* (2021).
30. Chen, R., *et al.* Immunotherapy of cholangiocarcinoma: Therapeutic strategies and predictive biomarkers. *Cancer Lett* **546**, 215853 (2022).
31. Zhang, W., *et al.* Next-generation sequencing-guided molecular-targeted therapy and immunotherapy for biliary tract cancers. *Cancer Immunol Immunother* **70**, 1001-1014 (2021).
32. Kim, R.D., *et al.* A Phase 2 Multi-institutional Study of Nivolumab for Patients With Advanced Refractory Biliary Tract Cancer. *JAMA Oncol* **6**, 888-894 (2020).
33. Piha-Paul, S.A., *et al.* Efficacy and safety of pembrolizumab for the treatment of advanced biliary cancer: Results from the KEYNOTE-158 and KEYNOTE-028 studies. *Int J Cancer* **147**, 2190-2198 (2020).
34. Rizzo, A., Ricci, A.D. & Brandi, G. PD-L1, TMB, MSI, and Other Predictors of Response to Immune Checkpoint Inhibitors in Biliary Tract Cancer. *Cancers (Basel)* **13**(2021).
35. Sabbatino, F., *et al.* PD-L1 and HLA Class I Antigen Expression and Clinical Course of the Disease in Intrahepatic Cholangiocarcinoma. *Clin Cancer Res* **22**, 470-478 (2016).
36. Sato, Y., *et al.* The PD-1/PD-L1 axis may be aberrantly activated in occupational cholangiocarcinoma. *Pathol Int* **67**, 163-170 (2017).
37. Mou, H., *et al.* Successful response to the combination of immunotherapy and chemotherapy in cholangiocarcinoma with high tumour mutational burden and PD-L1 expression: a case report. *BMC Cancer* **18**, 1105 (2018).
38. Kriegsmann, M., *et al.* Programmed cell death ligand 1 (PD-L1, CD274) in cholangiocarcinoma - correlation with clinicopathological data and comparison of antibodies. *BMC Cancer* **19**, 72 (2019).
39. Chiang, N.J., *et al.* The immune microenvironment features and response to immunotherapy in EBV-associated lymphoepithelioma-like cholangiocarcinoma. *Hepatology Int* **16**, 1137-1149 (2022).
40. Deng, M., *et al.* Relationship between PD-L1 expression, CD8+ T-cell infiltration and prognosis in intrahepatic cholangiocarcinoma patients. *Cancer Cell Int* **21**, 371 (2021).
41. Byeon, S.J., *et al.* Prognostic roles of leptin-signaling proteins, PD-L1, and tumor-infiltrating lymphocytes in surgically-resected biliary tract cancers. *J Surg Oncol* (2022).
42. Hendry, S., *et al.* Assessing Tumor-Infiltrating Lymphocytes in Solid Tumors: A Practical Review for Pathologists and Proposal for a Standardized Method from the International Immuno-Oncology Biomarkers Working Group: Part 2: TILs in Melanoma, Gastrointestinal Tract Carcinomas, Non-Small Cell Lung Carcinoma and Mesothelioma, Endometrial and Ovarian Carcinomas, Squamous Cell Carcinoma of the Head and Neck,

- Genitourinary Carcinomas, and Primary Brain Tumors. *Adv Anat Pathol* **24**, 311-335 (2017).
43. Amgad, M., *et al.* Report on computational assessment of Tumor Infiltrating Lymphocytes from the International Immuno-Oncology Biomarker Working Group. *NPI Breast Cancer* **6**, 16 (2020).
  44. Hendry, S., *et al.* Assessing Tumor-infiltrating Lymphocytes in Solid Tumors: A Practical Review for Pathologists and Proposal for a Standardized Method From the International Immunooncology Biomarkers Working Group: Part 1: Assessing the Host Immune Response, TILs in Invasive Breast Carcinoma and Ductal Carcinoma In Situ, Metastatic Tumor Deposits and Areas for Further Research. *Adv Anat Pathol* **24**, 235-251 (2017).
  45. Vennapusa, B., *et al.* Development of a PD-L1 Complementary Diagnostic Immunohistochemistry Assay (SP142) for Atezolizumab. *Appl Immunohistochem Mol Morphol* **27**, 92-100 (2019).
  46. Kulangara, K., *et al.* Clinical Utility of the Combined Positive Score for Programmed Death Ligand-1 Expression and the Approval of Pembrolizumab for Treatment of Gastric Cancer. *Arch Pathol Lab Med* **143**, 330-337 (2019).
  47. Kerr, K.M., *et al.* Programmed Death-Ligand 1 Immunohistochemistry in Lung Cancer: In what state is this art? *J Thorac Oncol* **10**, 985-989 (2015).
  48. Mastracci, L., *et al.* PD-L1 evaluation in the gastrointestinal tract: from biological rationale to its clinical application. *Pathologica* **114**, 352-364 (2022).
  49. Hogdall, D., Lewinska, M. & Andersen, J.B. Desmoplastic Tumor Microenvironment and Immunotherapy in Cholangiocarcinoma. *Trends Cancer* **4**, 239-255 (2018).
  50. Wu, L., *et al.* An invasive zone in human liver cancer identified by Stereo-seq promotes hepatocyte-tumor cell crosstalk, local immunosuppression and tumor progression. *Cell Res* (2023).
  51. Dama, P., Tang, M., Fulton, N., Kline, J. & Liu, H. Gal9/Tim-3 expression level is higher in AML patients who fail chemotherapy. *J Immunother Cancer* **7**, 175 (2019).
  52. Vaeteewoottacharn, K., *et al.* Facilitating cholangiocarcinoma inhibition by targeting CD47. *Exp Mol Pathol* **140**, 104935 (2024).
  53. Yasinska, I.M., *et al.* The Tim-3-Galectin-9 Pathway and Its Regulatory Mechanisms in Human Breast Cancer. *Front Immunol* **10**, 1594 (2019).
  54. Bello-Gamboa, A., *et al.* Actin reorganization at the centrosomal area and the immune synapse regulates polarized secretory traffic of multivesicular bodies in T lymphocytes. *J Extracell Vesicles* **9**, 1759926 (2020).
  55. Cao, L., *et al.* Prognostic Role of Immune Checkpoint Regulators in Cholangiocarcinoma: A Pilot Study. *J Clin Med* **10**(2021).
  56. Carnevale, G., *et al.* Activation of Fas/FasL pathway and the role of c-FLIP in primary culture of human cholangiocarcinoma cells. *Sci Rep* **7**, 14419 (2017).
  57. Pan, G., *et al.* Reciprocal co-expression of Fas and Fas ligand in human cholangiocarcinoma. *Int J Oncol* **31**, 843-850 (2007).
  58. Ivashkiv, L.B. IFN $\gamma$ : signalling, epigenetics and roles in immunity, metabolism, disease and cancer immunotherapy. *Nat Rev Immunol* **18**, 545-558 (2018).
  59. Gbolahan, O., Hashemi-Sadraei, N. & O'Neil, B. Prolonged Response to Anti-PD-1 Antibody Therapy in Chemotherapy-Refractory Cholangiocarcinoma With High Tumor Mutational Burden. *J Natl Compr Canc Netw* **17**, 644-648 (2019).
  60. Loeuillard, E., Conboy, C.B., Gores, G.J. & Rizvi, S. Immunobiology of cholangiocarcinoma. *JHEP Rep* **1**, 297-311 (2019).
  61. Kim, H., *et al.* Programmed Death Ligand 1 Expression as a Prognostic Marker in Patients with Advanced Biliary Tract Cancer. *Oncology* **99**, 365-372 (2021).
  62. Job, S., *et al.* Identification of Four Immune Subtypes Characterized by Distinct Composition and Functions of Tumor Microenvironment in Intrahepatic Cholangiocarcinoma. *Hepatology* **72**, 965-981 (2020).

63. Martin-Serrano, M.A., *et al.* Novel microenvironment-based classification of intrahepatic cholangiocarcinoma with therapeutic implications. *Gut* (2022).
64. Gershwin, M.E., *et al.* Primary biliary cirrhosis: an orchestrated immune response against epithelial cells. *Immunol Rev* **174**, 210-225 (2000).
65. Saidman, S.L., *et al.* Recognition of major histocompatibility complex antigens on cultured human biliary epithelial cells by alloreactive lymphocytes. *Hepatology* **13**, 239-246 (1991).
66. Oguma, S., Belle, S., Starzl, T.E. & Demetris, A.J. A histometric analysis of chronically rejected human liver allografts: insights into the mechanisms of bile duct loss: direct immunologic and ischemic factors. *Hepatology* **9**, 204-209 (1989).
67. Demetris, A.J., *et al.* The liver allograft, chronic (ductopenic) rejection, and microchimerism: what can they teach us? *Transplant Proc* **27**, 67-70 (1995).
68. Demetris, A.J., Lasky, S., Van Thiel, D.H., Starzl, T.E. & Dekker, A. Pathology of hepatic transplantation: A review of 62 adult allograft recipients immunosuppressed with a cyclosporine/steroid regimen. *Am J Pathol* **118**, 151-161 (1985).
69. Terminology for hepatic allograft rejection. International Working Party. *Hepatology* **22**, 648-654 (1995).
70. Oguma, S., *et al.* Chronic liver allograft rejection and obliterative arteriopathy: possible pathogenic mechanisms. *Transplant Proc* **21**, 2203-2207 (1989).
71. Demetris, A.J. Distinguishing between recurrent primary sclerosing cholangitis and chronic rejection. *Liver Transpl* **12**, S68-72 (2006).
72. Demetris, A.J., *et al.* Small proline-rich proteins (SPRR) function as SH3 domain ligands, increase resistance to injury and are associated with epithelial-mesenchymal transition (EMT) in cholangiocytes. *J Hepatol* **48**, 276-288 (2008).
73. Demetris, A.J., *et al.* Wound healing in the biliary tree of liver allografts. *Cell Transplant* **15 Suppl 1**, S57-65 (2006).
74. Demetris, A.J., *et al.* Immunopathology of antibodies as effectors of orthotopic liver allograft rejection. *Semin Liver Dis* **12**, 51-59 (1992).
75. Demetris, A.J. Immune cholangitis: liver allograft rejection and graft-versus-host disease. *Mayo Clin Proc* **73**, 367-379 (1998).
76. Lerut, J., *et al.* Intrahepatic bile duct strictures after human orthotopic liver transplantation. Recurrence of primary sclerosing cholangitis or unusual presentation of allograft rejection? *Transpl Int* **1**, 127-130 (1988).
77. Lunz, J.G., 3rd, *et al.* Replicative senescence of biliary epithelial cells precedes bile duct loss in chronic liver allograft rejection: increased expression of p21(WAF1/Cip1) as a disease marker and the influence of immunosuppressive drugs. *Am J Pathol* **158**, 1379-1390 (2001).
78. Blakolmer, K., *et al.* Analysis of the reversibility of chronic liver allograft rejection implications for a staging schema. *Am J Surg Pathol* **23**, 1328-1339 (1999).
79. Pappo, O., Ramos, H., Starzl, T.E., Fung, J.J. & Demetris, A.J. Structural integrity and identification of causes of liver allograft dysfunction occurring more than 5 years after transplantation. *Am J Surg Pathol* **19**, 192-206 (1995).
80. Blakolmer, K., *et al.* Chronic liver allograft rejection in a population treated primarily with tacrolimus as baseline immunosuppression: long-term follow-up and evaluation of features for histopathological staging. *Transplantation* **69**, 2330-2336 (2000).
81. Miglio, F., *et al.* Expression of major histocompatibility complex class II antigens on bile duct epithelium in patients with hepatic graft-versus-host disease after bone marrow transplantation. *J Hepatol* **5**, 182-189 (1987).
82. Ayres, R.C., Neuberger, J.M., Shaw, J., Joplin, R. & Adams, D.H. Intercellular adhesion molecule-1 and MHC antigens on human intrahepatic bile duct cells: effect of pro-inflammatory cytokines. *Gut* **34**, 1245-1249 (1993).

83. Cruickshank, S.M., Southgate, J., Selby, P.J. & Trejdosiewicz, L.K. Expression and cytokine regulation of immune recognition elements by normal human biliary epithelial and established liver cell lines in vitro. *J Hepatol* **29**, 550-558 (1998).
84. Hreha, G., *et al.* Immortalized intrahepatic mouse biliary epithelial cells: immunologic characterization and immunogenicity. *Hepatology* **30**, 358-371 (1999).
85. Kambayashi, T. & Laufer, T.M. Atypical MHC class II-expressing antigen-presenting cells: can anything replace a dendritic cell? *Nat Rev Immunol* **14**, 719-730 (2014).
86. Huard, B., Tournier, M., Hercend, T., Triebel, F. & Faure, F. Lymphocyte-activation gene 3/major histocompatibility complex class II interaction modulates the antigenic response of CD4+ T lymphocytes. *Eur J Immunol* **24**, 3216-3221 (1994).
87. Huard, B., Prigent, P., Pages, F., Bruniquel, D. & Triebel, F. T cell major histocompatibility complex class II molecules down-regulate CD4+ T cell clone responses following LAG-3 binding. *Eur J Immunol* **26**, 1180-1186 (1996).
88. Balko, J.M., *et al.* MHC-II expression to drive a unique pattern of adaptive resistance to antitumor immunity through receptor checkpoint engagement. **36**, 180-180 (2018).
89. Guy, C., *et al.* LAG3 associates with TCR-CD3 complexes and suppresses signaling by driving co-receptor-Lck dissociation. *Nat Immunol* **23**, 757-767 (2022).
90. Hirashima, M., *et al.* Galectin-9 in physiological and pathological conditions. *Glycoconj J* **19**, 593-600 (2002).
91. Liberal, R., *et al.* The impaired immune regulation of autoimmune hepatitis is linked to a defective galectin-9/tim-3 pathway. *Hepatology* **56**, 677-686 (2012).
92. Wiersma, V.R., de Bruyn, M., Helfrich, W. & Bremer, E. Therapeutic potential of Galectin-9 in human disease. *Med Res Rev* **33 Suppl 1**, E102-126 (2013).
93. Tang, Z.H., *et al.* Tim-3/galectin-9 regulate the homeostasis of hepatic NKT cells in a murine model of nonalcoholic fatty liver disease. *J Immunol* **190**, 1788-1796 (2013).
94. Liu, Y.M., Chen, Y., Li, J.Z. & Gong, J.P. Up-regulation of Galectin-9 in vivo results in immunosuppressive effects and prolongs survival of liver allograft in rats. *Immunol Lett* **162**, 217-222 (2014).
95. Liu, Y., *et al.* Recipient T cell TIM-3 and hepatocyte galectin-9 signalling protects mouse liver transplants against ischemia-reperfusion injury. *J Hepatol* **62**, 563-572 (2015).
96. Golden-Mason, L. & Rosen, H.R. Galectin-9: Diverse roles in hepatic immune homeostasis and inflammation. *Hepatology* **66**, 271-279 (2017).
97. Wang, H., *et al.* Endometrial regenerative cells with galectin-9 high-expression attenuate experimental autoimmune hepatitis. *Stem Cell Res Ther* **12**, 541 (2021).
98. Yang, R., *et al.* Development and characterization of anti-galectin-9 antibodies that protect T cells from galectin-9-induced cell death. *J Biol Chem* **298**, 101821 (2022).
99. Hai Nam, N., *et al.* Increased Expressions of Programmed Death Ligand 1 and Galectin 9 in Transplant Recipients Who Achieved Tolerance After Immunosuppression Withdrawal. *Liver Transpl* **28**, 647-658 (2022).
100. Hainz, U., *et al.* Monocyte-mediated T-cell suppression and augmented monocyte tryptophan catabolism after human hematopoietic stem-cell transplantation. *Blood* **105**, 4127-4134 (2005).
101. Hainz, U., Jurgens, B. & Heitger, A. The role of indoleamine 2,3-dioxygenase in transplantation. *Transpl Int* **20**, 118-127 (2007).
102. Ghimire, S., *et al.* Pathophysiology of GvHD and Other HSCT-Related Major Complications. *Front Immunol* **8**, 79 (2017).
103. Demetris, A.J., *et al.* Functional Immune Anatomy of the Liver-As an Allograft. *Am J Transplant* **16**, 1653-1680 (2016).
104. Reynoso-Paz, S., *et al.* The immunobiology of bile and biliary epithelium. *Hepatology* **30**, 351-357 (1999).
105. Rabinovich, G.A., *et al.* Galectins and their ligands: amplifiers, silencers or tuners of the inflammatory response? *Trends Immunol* **23**, 313-320 (2002).

106. Liu, F.T. & Rabinovich, G.A. Galectins as modulators of tumour progression. *Nat Rev Cancer* **5**, 29-41 (2005).
107. Thijssen, V.L., Heusschen, R., Caers, J. & Griffioen, A.W. Galectin expression in cancer diagnosis and prognosis: A systematic review. *Biochim Biophys Acta* **1855**, 235-247 (2015).
108. Johannes, L., Jacob, R. & Leffler, H. Galectins at a glance. *J Cell Sci* **131**(2018).
109. Brinchmann, M.F., Patel, D.M. & Iversen, M.H. The Role of Galectins as Modulators of Metabolism and Inflammation. *Mediators Inflamm* **2018**, 9186940 (2018).
110. Tureci, O., Schmitt, H., Fadle, N., Pfreundschuh, M. & Sahin, U. Molecular definition of a novel human galectin which is immunogenic in patients with Hodgkin's disease. *J Biol Chem* **272**, 6416-6422 (1997).
111. Wada, J. & Kanwar, Y.S. Identification and characterization of galectin-9, a novel beta-galactoside-binding mammalian lectin. *J Biol Chem* **272**, 6078-6086 (1997).
112. Zhu, C., *et al.* The Tim-3 ligand galectin-9 negatively regulates T helper type 1 immunity. *Nat Immunol* **6**, 1245-1252 (2005).
113. Nagahara, K., *et al.* Galectin-9 increases Tim-3+ dendritic cells and CD8+ T cells and enhances antitumor immunity via galectin-9-Tim-3 interactions. *J Immunol* **181**, 7660-7669 (2008).
114. Su, E.W., Bi, S. & Kane, L.P. Galectin-9 regulates T helper cell function independently of Tim-3. *Glycobiology* **21**, 1258-1265 (2011).
115. Nebbia, G., *et al.* Upregulation of the Tim-3/galectin-9 pathway of T cell exhaustion in chronic hepatitis B virus infection. *PLoS One* **7**, e47648 (2012).
116. Li, H., *et al.* Tim-3/galectin-9 signaling pathway mediates T-cell dysfunction and predicts poor prognosis in patients with hepatitis B virus-associated hepatocellular carcinoma. *Hepatology* **56**, 1342-1351 (2012).
117. Curley, J., *et al.* Looking past PD-L1: expression of immune checkpoint TIM-3 and its ligand galectin-9 in cervical and vulvar squamous neoplasia. *Mod Pathol* **33**, 1182-1192 (2020).
118. Yang, R., *et al.* Galectin-9 interacts with PD-1 and TIM-3 to regulate T cell death and is a target for cancer immunotherapy. *Nat Commun* **12**, 832 (2021).
119. Chen, Z., Dong, D., Zhu, Y., Pang, N. & Ding, J. The role of Tim-3/Galectin-9 pathway in T-cell function and prognosis of patients with human papilloma virus-associated cervical carcinoma. *FASEB J* **35**, e21401 (2021).
120. Koch, C., *et al.* Poor Prognosis of Advanced Cholangiocarcinoma: Real-World Data from a Tertiary Referral Center. *Digestion* **101**, 458-465 (2020).
121. Valle, J.W., Kelley, R.K., Nervi, B., Oh, D.Y. & Zhu, A.X. Biliary tract cancer. *Lancet* **397**, 428-444 (2021).
122. Abou-Alfa, G.K., *et al.* Ivosidenib in IDH1-mutant, chemotherapy-refractory cholangiocarcinoma (ClarIDHy): a multicentre, randomised, double-blind, placebo-controlled, phase 3 study. *Lancet Oncol* **21**, 796-807 (2020).
123. Abou-Alfa, G.K., *et al.* Pemigatinib for previously treated, locally advanced or metastatic cholangiocarcinoma: a multicentre, open-label, phase 2 study. *Lancet Oncol* **21**, 671-684 (2020).
124. Goyal, L., *et al.* Futibatinib for FGFR2-Rearranged Intrahepatic Cholangiocarcinoma. *N Engl J Med* **388**, 228-239 (2023).
125. Javle, M., *et al.* Pertuzumab and trastuzumab for HER2-positive, metastatic biliary tract cancer (MyPathway): a multicentre, open-label, phase 2a, multiple basket study. *Lancet Oncol* **22**, 1290-1300 (2021).
126. Subbiah, V., *et al.* Dabrafenib plus trametinib in patients with BRAF(V600E)-mutated biliary tract cancer (ROAR): a phase 2, open-label, single-arm, multicentre basket trial. *Lancet Oncol* **21**, 1234-1243 (2020).

127. Javle, M., *et al.* Biliary cancer: Utility of next-generation sequencing for clinical management. *Cancer* **122**, 3838-3847 (2016).
128. Zhang, Y., Esmail, A., Mazzaferro, V. & Abdelrahim, M. Newest Therapies for Cholangiocarcinoma: An Updated Overview of Approved Treatments with Transplant Oncology Vision. *Cancers (Basel)* **14**(2022).
129. Vogel, A., *et al.* Biliary tract cancer: ESMO Clinical Practice Guideline for diagnosis, treatment and follow-up. *Ann Oncol* **34**, 127-140 (2023).
130. Normanno, N., *et al.* Current practice of genomic profiling of patients with advanced solid tumours in Italy: the Italian Register of Actionable Mutations (RATIONAL) study. *Eur J Cancer* **187**, 174-184 (2023).
131. Silverman, I.M., *et al.* Clinicogenomic Analysis of FGFR2-Rearranged Cholangiocarcinoma Identifies Correlates of Response and Mechanisms of Resistance to Pemigatinib. *Cancer Discov* **11**, 326-339 (2021).
132. Mateo, J., *et al.* A framework to rank genomic alterations as targets for cancer precision medicine: the ESMO Scale for Clinical Actionability of molecular Targets (ESCAT). *Ann Oncol* **29**, 1895-1902 (2018).
133. Normanno, N., *et al.* Role of molecular genetics in the clinical management of cholangiocarcinoma. *ESMO Open* **7**, 100505 (2022).
134. Mosele, F., *et al.* Recommendations for the use of next-generation sequencing (NGS) for patients with metastatic cancers: a report from the ESMO Precision Medicine Working Group. *Ann Oncol* **31**, 1491-1505 (2020).
135. Associazione Italiana per lo Studio del Fegato (AISF), I.H.-., PancreatoBiliary Association (IT-IHPBA), A.I.d.O.M. & (AIOM). Colangiocarcinoma intraepatico e perilare: linee guida per la pratica clinica. (2022).
136. Pinto, C., *et al.* Molecular tests and target therapies in oncology: recommendations from the Italian workshop. *Future Oncol* **17**, 3529-3539 (2021).
137. Rimassa, L., *et al.* Diagnosis and treatment of cholangiocarcinoma in Italy: A Delphi consensus statement. *Crit Rev Oncol Hematol* **192**, 104146 (2023).
138. Fassan, M., *et al.* Practical guidelines for molecular testing of cholangiocarcinoma in clinical practice: Italian experts' position paper. *Crit Rev Oncol Hematol* **194**, 104224 (2024).
139. Uson Junior, P.L.S. & Araujo, R.L. Immunotherapy in biliary tract cancers: Current evidence and future perspectives. *World J Gastrointest Oncol* **14**, 1446-1455 (2022).
140. Moris, D., *et al.* Advances in the treatment of intrahepatic cholangiocarcinoma: An overview of the current and future therapeutic landscape for clinicians. *CA Cancer J Clin* (2022).
141. Kalyan, A., Khosla, H. & Kim, R.D. Immunotherapy in Biliary Tract Cancers: Where Are We? *Curr Oncol Rep* (2022).
142. Ueno, M., *et al.* Nivolumab alone or in combination with cisplatin plus gemcitabine in Japanese patients with unresectable or recurrent biliary tract cancer: a non-randomised, multicentre, open-label, phase 1 study. *Lancet Gastroenterol Hepatol* **4**, 611-621 (2019).
143. Oh, D.Y., *et al.* Gemcitabine and cisplatin plus durvalumab with or without tremelimumab in chemotherapy-naive patients with advanced biliary tract cancer: an open-label, single-centre, phase 2 study. *Lancet Gastroenterol Hepatol* **7**, 522-532 (2022).
144. Zou, S., *et al.* Mutational landscape of intrahepatic cholangiocarcinoma. *Nat Commun* **5**, 5696 (2014).
145. Jiao, Y., *et al.* Exome sequencing identifies frequent inactivating mutations in BAP1, ARID1A and PBRM1 in intrahepatic cholangiocarcinomas. *Nat Genet* **45**, 1470-1473 (2013).

146. Mazur, P.K., *et al.* Expression and clinicopathological significance of notch signaling and cell-fate genes in biliary tract cancer. *Am J Gastroenterol* **107**, 126-135 (2012).
147. Gu, T.L., *et al.* Survey of tyrosine kinase signaling reveals ROS kinase fusions in human cholangiocarcinoma. *PLoS One* **6**, e15640 (2011).
148. Guo, L., *et al.* Screening and identification of genes associated with cell proliferation in cholangiocarcinoma. *Aging (Albany NY)* **12**, 2626-2646 (2020).
149. Xu, S.F., *et al.* Somatic Mutation Profiling of Intrahepatic Cholangiocarcinoma: Comparison between Primary and Metastasis Tumor Tissues. *J Oncol* **2020**, 5675020 (2020).
150. Kang, Y.K., Kim, W.H., Lee, H.W., Lee, H.K. & Kim, Y.I. Mutation of p53 and K-ras, and loss of heterozygosity of APC in intrahepatic cholangiocarcinoma. *Lab Invest* **79**, 477-483 (1999).
151. Xu, Y.F., *et al.* Fibroblast growth factor receptor 4 promotes progression and correlates to poor prognosis in cholangiocarcinoma. *Biochem Biophys Res Commun* **446**, 54-60 (2014).
152. Wang, J., *et al.* Coding-noncoding gene expression in intrahepatic cholangiocarcinoma. *Transl Res* **168**, 107-121 (2016).
153. Borger, D.R., *et al.* Frequent mutation of isocitrate dehydrogenase (IDH)1 and IDH2 in cholangiocarcinoma identified through broad-based tumor genotyping. *Oncologist* **17**, 72-79 (2012).
154. Lee, H., *et al.* Comprehensive genomic profiling of extrahepatic cholangiocarcinoma reveals a long tail of therapeutic targets. *J Clin Pathol* **69**, 403-408 (2016).
155. Della Torre, G., *et al.* TP53 mutations and mdm2 protein overexpression in cholangiocarcinomas. *Diagn Mol Pathol* **9**, 41-46 (2000).
156. Baudhuin, L.M., *et al.* MYH Y165C and G382D mutations in hepatocellular carcinoma and cholangiocarcinoma patients. *J Cancer Res Clin Oncol* **132**, 159-162 (2006).
157. Singuksawat, E., Thuwajit, C., Charngkaew, K. & Thuwajit, P. Increased ETV4 expression correlates with estrogen-enhanced proliferation and invasiveness of cholangiocarcinoma cells. *Cancer Cell Int* **18**, 25 (2018).
158. Ross, J.S., *et al.* New routes to targeted therapy of intrahepatic cholangiocarcinomas revealed by next-generation sequencing. *Oncologist* **19**, 235-242 (2014).
159. Kang, Z., Guo, L., Zhu, Z. & Qu, R. Identification of prognostic factors for intrahepatic cholangiocarcinoma using long non-coding RNAs-associated ceRNA network. *Cancer Cell Int* **20**, 315 (2020).
160. Trombetta, D., Parente, P., Latiano, T.P., Fabrizio, F.P. & Muscarella, L.A. Identification of EML4-ALK fusion in a sporadic case of cholangiocarcinoma. *Eur J Intern Med* **71**, 92-94 (2020).
161. Favre, L., Pujals, A., Maille, P., Pouillot, E. & Calderaro, J. Identification of an EML4-ALK rearrangement in an intrahepatic cholangiocarcinoma. *Pathol Int* (2021).
162. Xu, S., *et al.* Clinically significant genomic alterations in the Chinese and Western patients with intrahepatic cholangiocarcinoma. *BMC Cancer* **21**, 152 (2021).
163. Su, Y.L., *et al.* Remarkable Response to Olaparib in a Patient with Combined Hepatocellular-Cholangiocarcinoma Harboring a Biallelic BRCA2 Mutation. *Onco Targets Ther* **14**, 3895-3901 (2021).
164. Montal, R., *et al.* Molecular classification and therapeutic targets in extrahepatic cholangiocarcinoma. *J Hepatol* **73**, 315-327 (2020).
165. Deng, M., *et al.* Proteogenomic characterization of cholangiocarcinoma. *Hepatology* (2022).
166. Johnson, D.B., *et al.* Melanoma-specific MHC-II expression represents a tumour-autonomous phenotype and predicts response to anti-PD-1/PD-L1 therapy. *Nat Commun* **7**, 10582 (2016).

167. Roemer, M.G.M., *et al.* Major Histocompatibility Complex Class II and Programmed Death Ligand 1 Expression Predict Outcome After Programmed Death 1 Blockade in Classic Hodgkin Lymphoma. *J Clin Oncol* **36**, 942-950 (2018).
168. Wang, Y., Zhao, E., Zhang, Z., Zhao, G. & Cao, H. Association between Tim-3 and Gal-9 expression and gastric cancer prognosis. *Oncol Rep* **40**, 2115-2126 (2018).
169. Sun, Q., *et al.* Prognostic and diagnostic significance of galectins in pancreatic cancer: a systematic review and meta-analysis. *Cancer Cell Int* **19**, 309 (2019).
170. Sideras, K., *et al.* PD-L1, Galectin-9 and CD8(+) tumor-infiltrating lymphocytes are associated with survival in hepatocellular carcinoma. *Oncoimmunology* **6**, e1273309 (2017).
171. Dolusic, E., *et al.* Tryptophan 2,3-dioxygenase (TDO) inhibitors. 3-(2-(pyridyl)ethenyl)indoles as potential anticancer immunomodulators. *J Med Chem* **54**, 5320-5334 (2011).