



UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI TORINO

DIPARTIMENTO DI BIOTECNOLOGIE MOLECOLARI E SCIENZE DELLA SALUTE

DOTTORATO DI RICERCA IN SCIENZE BIOMEDICHE ED ONCOLOGIA

Ciclo XXXII

Tumori stromali gastrointestinali (GIST) c-KIT/PDGFR wild-type resistenti ad Imatinib: modello preclinico e potenziali strategie immunoterapiche

Tesi presentata da: **Dott.ssa Erika Fiorino**

Tutor: **Prof. Massimo Aglietta**

Tutor di tesi: **Prof. Dario Sangiolo**

Coordinatore del dottorato: **Prof. Emilio Hirsch**

Anni accademici: **2016-2020**

Settore scientifico/disciplinare di afferenza: **MED/06**

INDICE

| | | |
|----|---|-----------|
| 1. | RIASSUNTO | 1 |
| 2. | INTRODUZIONE E SCOPO DEL LAVORO | 4 |
| | 2.1 Tumori Gastrointestinali Stromali (GIST)..... | 4 |
| | 2.1.1 Diagnosi e mutazioni dei GIST..... | 4 |
| | 2.1.2 Tipologia di trattamenti..... | 6 |
| | 2.1.3 Resistenza ad Imatinib e terapie a bersaglio molecolare di seconda e Terza linea..... | 6 |
| | 2.2 Immunoterapia nei tumori solidi..... | 8 |
| | 2.2.1 Immunoterapia con citochine..... | 9 |
| | 2.2.2 Immunoterapia con inibitori dei checkpoints immunitari..... | 9 |
| | 2.2.3 Immunoterapia cellulare adottiva..... | 10 |
| 3. | MATERIALI E METODI | 14 |
| | 3.1 Pazienti..... | 14 |
| | 3.2 Coltura di linee cellulari primarie di GIST wild-type..... | 14 |
| | 3.3 Tumorigenicità delle linee wtGIST..... | 14 |
| | 3.4 Sensibilità a Imatinib e Sunitinib delle linee wtGIST..... | 15 |
| | 3.5 Sensibilità ad IFN α e IFN γ di linee wtGIST..... | 15 |
| | 3.6 Combinazione terapeutica di IFNs con i farmaci a bersaglio molecolare..... | 16 |
| | 3.7 Analisi fenotipica delle linee wtGIST..... | 16 |
| | 3.8 Valutazione dei recettori di IFNs in linee wtGIST tramite citofluorimetria e Real-Time PCR..... | 17 |
| | 3.9 Produzione di VEGF <i>in vitro</i> | 18 |
| | 3.10 Espansione <i>ex vivo</i> delle CIK di paziente..... | 18 |
| | 3.11 Analisi fenotipica delle CIK..... | 18 |
| | 3.12 Attività citotossica <i>in vitro</i> delle CIK..... | 19 |
| | 3.13 Linea cellulare NK-92 e attività citotossica <i>in vitro</i> | 19 |
| | 3.14 Analisi statistica..... | 20 |

| | | |
|-------|--|-----------|
| 4. | RISULTATI..... | 21 |
| 4.1 | Generazione di linee primarie derivate da pazienti affetti da GIST wild-type..... | 21 |
| 4.2 | Sensibilità a farmaci a bersaglio molecolare di linee wtGIST..... | 22 |
| 4.3 | Potenziale ruolo terapeutico e modulatore di IFN α e IFN γ in linee wtGIST | 23 |
| 4.3.1 | Attività antitumorale diretta di IFN α e IFN γ | 23 |
| 4.3.2 | Attività immunomodulatoria indiretta di IFN α e IFN γ | 24 |
| 4.4 | Espressione dei recettori di IFN α e γ in linee wtGIST..... | 27 |
| 4.5 | Combinazione terapeutica tra IFNs e farmaci a bersaglio molecolare | 29 |
| 4.6 | Generazione e caratterizzazione fenotipica di CIK da pazienti con diagnosi di GIST..... | 31 |
| 4.7 | Espressione dei ligandi dei recettori citotossici delle CIK in linee wtGIST..... | 33 |
| 4.8 | Attività antitumorale delle CIK e delle NK-92 contro linee wtGIST..... | 34 |
| 5. | DISCUSSIONE..... | 38 |
| 6. | BIBLIOGRAFIA..... | 42 |
| 7. | RINGRAZIAMENTI..... | 46 |

1. RIASSUNTO

Introduzione e razionale

I tumori stromali gastrointestinali (GIST) sono le neoplasie mesenchimali più comuni dell'apparato gastrointestinale. I GIST presentano classicamente caratteristiche mutazioni driver nei geni c-KIT/PDGFR, con conseguente sensibilità alla terapia con l'inibitore specifico Imatinib. È stato descritto come comunque una quota minore di questi tumori possa non presentarle (wild-type, wtGIST), come condizione d'esordio alla diagnosi o perderle come conseguenza di prolungata terapia medica associata a possibile dedifferenziazione. Il nostro lavoro di ricerca è dedicato alla generazione di un modello preclinico di wtGIST refrattari a terapie convenzionali funzionale all'esplorazione di nuove strategie terapeutiche principalmente di tipo immunoterapico.

In questa direzione ci siamo in particolare focalizzati sugli effetti antitumorali diretti ed immunomodulatori degli interferoni (IFNs) α e γ , unitamente ad un approccio di immunoterapia cellulare con linfociti killer HLA indipendenti.

Obiettivi

Obiettivo principale del nostro lavoro è stato quello di generare un modello preclinico di wtGIST che riflettesse lo scenario clinico di resistenza alle terapie convenzionali, permettendo l'esplorazione funzionale di nuove strategie immunoterapiche.

Obiettivi specifici sono stati 1) Generazione e caratterizzazione di linee primarie derivate da pazienti affetti da wtGIST, inclusa loro tumorigenicità e sensibilità a farmaci a bersaglio molecolare; 2) Valutazione dell'attività di IFN α e IFN γ contro linee wtGIST, inclusa citotossicità diretta, combinazione con target therapy, ed effetti immunomodulatori su PD-L1/2 e molecole HLA; 3) Attività antitumorale contro wtGIST di immunoterapia cellulare con linfociti killer CIK ed NK-92.

Risultati

Linee primarie wtGIST.

Dall'analisi molecolare di 38 biopsie chirurgiche, abbiamo riscontrato la presenza di 18 GIST wild-type, di cui 5/38 (5%) alla diagnosi mentre per i restanti 13 si trattava di campioni prelevati dopo prolungata terapia con Imatinib (media 26 mesi). Da questi siamo riusciti a generare 11 linee *in vitro* di wtGIST, confermandone la tumorigenicità in vivo (7/11), la resistenza *in vitro* ad Imatinib (IM) (IC₅₀ 17 μ M,) e moderata sensibilità a Sunitinib (SU) (IC₅₀ 6 μ M).

Attività di IFN α e IFN γ in wtGIST.

Abbiamo testato in primis la potenziale azione citotossica diretta degli IFNs su wtGIST. Il trattamento *in vitro* con IFN α (n=11) ha dimostrato attività contro 4/8 (50%) wtGIST testati, con una mortalità media di 42% \pm 9; le restanti linee hanno mostrato una chiara resistenza con mortalità pari a 8% \pm 4. Tutte le linee wtGIST testate (8/8) sono risultate invece resistenti all'azione citotossica diretta di IFN γ , con mortalità media pari a 6% \pm 2,5 (n=20). In multipli esperimenti non è stata evidenziato beneficio o sinergismo dall'associazione di IFNs con i farmaci a bersaglio molecolare IM (n=6) o SU (n=8). Dal punto di vista di una potenziale azione immunomodulatoria, il trattamento *in vitro* con IFN α e IFN γ (n=19) ha determinato citofluorimetricamente un aumento

significativo dell'espressione di membrana rispettivamente di PD-L1 (IFN α 57% \pm 7; IFN γ 67% \pm 7,4; controllo 38% \pm 7,3) e di PD-L2 (IFN α 40% \pm 8,2; IFN γ 55% \pm 6,1; controllo 28% \pm 5,9). Il trattamento *in vitro* con IFN α (n=20) e IFN γ (n=21) ha inoltre determinato un incremento significativo dell'intensità di espressione (MFI) delle molecole HLA classe I (IFN α 217, IFN γ 285; controllo 126) e β 2-microglobulina (IFN α 383, IFN γ 342, controllo 201), presupposto fondamentale per una efficace risposta immunitaria. Un'analisi quantitativa con qRT-PCR non ha evidenziato significative riduzioni a livello trascrizionale dei recettori per IFN α e IFN γ sulle nostre linee di wtGIST. A livello proteico, l'espressione in membrana valutata citofluorimetricamente, ha invece messo in evidenza livelli inferiori di IFN α R1 nelle linee wtGIST resistenti ad IFN α , rispetto alle linee sensibili (6% \pm 0,5 e 12% \pm 2, rispettivamente, n=3). Ipotizzando un possibile feedback negativo, alimentato da una produzione autocrina di VEGF in grado di promuovere la degradazione intracellulare dell'IFN α R1, è stata osservata una differenza significativa di produzione di VEGF tra wtGIST resistente e sensibile ad IFN α (245,6 pg/ml vs 67 pg/ml, rispettivamente, p<0.0005).

Immunoterapia cellulare contro wtGIST.

Abbiamo sfruttato la nostra piattaforma sperimentale per esplorare l'attività di un approccio immunoterapico con linfociti killer contro wtGIST. Linfociti CIK, un peculiare subset di linfociti a fenotipo T-NK ed attività antitumorale HLA indipendente, sono stati generati da 13 pazienti affetti da GIST. Espansione mediana delle CIK è stata di 81 fold (range 13-752). Fenotipicamente le CIK si sono confermate in prevalenza CD3⁺CD8⁺ (81% \pm 1,7) con la frazione CD3⁺CD56⁺, principale responsabile dell'attività antitumorale, pari a 43% (range 24-60). Abbiamo anche valutato l'espressione in membrana di alcune molecole immunoregatorie quali PD1 (25% \pm 4), TIM3 (51% \pm 9), LAG3 (16% \pm 2,1) e TIGIT (74% \pm 4) (media \pm SEM).

Funzionalmente, linfociti CIK hanno efficacemente ucciso *in vitro* wtGIST testati in decrescenti rapporti effettore:bersaglio con una lisi tumore media pari a 67% \pm 4,7 (10:1), 52% \pm 4,4 (5:1), 39% \pm 4,7 (2.5:1) e 23% \pm 4,2 (1:1). Attività citotossica pressochè sovrapponibile è stata riscontrata con CIK testate sequenzialmente ad un precedente trattamento con farmaci a bersaglio molecolare (IM e SU) o IFNs. La suscettibilità di wtGIST ad immunoterapia cellulare HLA indipendente è stata testata in un secondo modello, utilizzando come effettori la linea Natural Killer NK-92, che condivide con le CIK il meccanismo di lisi tumorale mediato dal recettore NKG2D. Anche con NK-92 abbiamo osservato una importante attività antitumorale, esplorata anche a rapporti effettore:bersaglio particolarmente sfavorevoli: 68% \pm 5 (2:1); 53% \pm 5 (1:2); 32% \pm 4,2 (1:8).

Conclusioni.

Nel nostro lavoro abbiamo confermato l'importante frequenza di wtGIST dopo prolungata terapia medica con Imatinib, realizzando un modello sperimentale *in vitro* rappresentativo di questa condizione e funzionale per l'esplorazione di nuovi approcci terapeutici.

In prospettiva clinica queste osservazioni supportano l'opportunità di analisi molecolari su GIST recidivati, per una puntuale definizione mutazionale.

Sperimentalmente abbiamo riportato come l'IFN α possa esercitare un'azione citotossica diretta contro wtGIST, unitamente ad un'azione immunomodulatoria indiretta, supportando la riconsiderazione di questa citochina in possibili studi clinici mirati. La resistenza di wtGIST ad IFN α potrebbe essere legata ad una deficitaria espressione recettoriale. L'aumentata degradazione del recettore per IFN α potrebbe essere supportata da una secrezione autocrina di VEGF, offrendo

razionale per future esplorazioni di sinergismo con inibitori di VEGF. L'immunoterapia cellulare, sfruttando effettori HLA-indipendenti come CIK ed NK-92, ha dimostrato un'importante attività contro wtGIST, anche resistenti a terapia target o IFNs, offrendo razionale per esplorazioni dedicate nell'ambito di studi clinici controllati.

2. INTRODUZIONE E SCOPO DEL LAVORO

2.1 Tumori Gastrointestinali Stromali (GIST)

I Tumori Stromali Gastrointestinali (GIST) appartengono alla famiglia dei tumori mesenchimali, derivanti da tessuto connettivo, e sono le neoplasie più comuni del tratto gastrointestinale costituendo circa il 18% di tutti i sarcomi e l'1% di tutte le neoplasie intestinali (1, 2).

I GIST originano presumibilmente da cellule staminali mesenchimali destinate al differenziamento in cellule interstiziali del Cajal (ICCs), conosciute anche come "cellule pacemaker" in quanto responsabili del movimento autonomo del tratto gastrointestinale (3, 4) e si presentano principalmente in pazienti nella sesta decade di età, con un'incidenza annuale tra 10 e 20 casi per milione nella popolazione mondiale (5).

Questo tipo di neoplasia insorge prevalentemente nello stomaco (56%) e nel piccolo intestino (32%) ma, con minor incidenza, può originare anche nel colon-retto (6%), esofago (0,7%) o in altre zone del tratto gastrointestinale (5,5%). Una sede di insorgenza diversa dallo stomaco è associata ad un potenziale maligno più alto (6). Ad oggi si identifica come GIST una neoplasia mesenchimale caratterizzata dalla presenza di cellule fusate, epitelioidi e occasionalmente, pleomorfe.

2.1.1 Diagnosi e mutazioni dei GIST

I GIST possono essere diagnosticati attraverso esame ecografico, tomografia computerizzata (CT), risonanza magnetica (MRI) e tomografia a emissione di positroni (PET)(6). L'aspetto istologico dei GIST e le caratteristiche che ne definiscono il grado di malignità possono variare notevolmente da paziente a paziente.

La diagnosi differenziale tra GIST e altri tumori mesenchimali gastrointestinali può essere effettuata valutando la presenza del marker DOG1 (Discovered on GIST 1) e l'espressione dell'antigene CD117 (7). DOG1 è un gene che codifica per il canale cloridrico della proteina anoctamina 1 (ANO1/TMEM16A) ed è coinvolto nella proliferazione cellulare e nella

tumorigenesi in diversi tipi di tumore. DOG1 è considerato un marker specifico per i GIST indipendentemente dallo stato mutazionale di questi tumori (7).

CD117 è un epitopo del recettore KIT, una tirosin-chinasi transmembrana di tipo III. Questo recettore è codificato dal gene c-KIT il quale risulta mutato nel 75% dei GIST. Quando presenti, queste mutazioni rendono KIT costitutivamente attivo con conseguente omodimerizzazione e fosforilazione dei residui di tirosina intracellulari, anche in assenza del suo ligando stem cell factor (SCF)(8, 9). La fosforilazione costitutiva dei residui di tirosina porta all'attivazione a cascata delle proteine bersaglio coinvolte nella trasduzione del segnale tra cui MAPK, PI3K, STAT3, RAS e JACK2, coinvolte nella proliferazione cellulare e nell'inibizione dell'apoptosi (10, 11).

La maggior parte delle mutazioni di c-KIT (70-75%) coinvolgono l'esone 11 che codifica per la regione intracellulare juxtamembrana, importante nell'autoregolazione dell'attivazione del recettore. Queste mutazioni possono essere delezioni, inserzioni o sostituzioni amminoacidiche. Le delezioni, in particolare nei codoni 557 e/o 558, sono associate ad un fenotipo più aggressivo (8). Nel 12-15% dei casi le mutazioni su c-KIT colpiscono l'esone 9, che codifica per il dominio extracellulare del recettore. Altre mutazioni sono meno frequenti, come quelle negli esoni 13 e 17 che invece codificano per la porzione tirosin-chinasica (7, 12). La presenza di mutazioni nel gene c-KIT rappresenta un vantaggio terapeutico in quanto rappresenta un target molecolare degli inibitori tirosin-chinasici per esso specifici.

Tra i GIST non mutati sul gene c-KIT sono state descritte altre mutazioni tra cui prevalentemente quella in PDGFRA, gene che codifica per il recettore α del fattore di crescita derivato dalle piastrine (PDGFR α). Le mutazioni in PDGFRA coinvolgono il dominio juxtamembrana (esone 12), il dominio di legame con l'ATP (esone 14) o il dominio di attivazione (esone 18)(8). Molte delle mutazioni nell'esone 18, in particolare la D842V, conferiscono resistenza alla terapia con Imatinib (8). Anche le mutazioni su PDGFRA risultano in un'attivazione costitutiva del recettore anche in assenza di ligando, attivando le stesse vie di segnale dei GIST c-KIT mutati. I GIST mutati in PDGFRA mostrano un diverso profilo di espressione genica, una localizzazione prevalentemente gastrica e un minor potenziale di malignità (7, 8).

Esistono anche GIST che non presentano nessuna delle comuni mutazioni in c-KIT o PDGFRA e vengono per questo definiti "wild-type"(8). Si tratta di un gruppo eterogeneo di tumori che potrebbero presentare diverse alterazioni genetiche, come la sostituzione V600E sul gene di BRAF, che può essere causa di resistenza agli inibitori chinasi per KIT e PDGFR α (8). Circa la metà dei

GIST WT sono mutati sul gene della succinato-deidrogenasi (SDH) che porta a maggiore espressione del recettore 1 per il fattore di crescita dell'insulina (IGF1R) responsabile dell'attivazione della via di trasduzione mediata da MAPK e PI3K/AKT, contribuendo alla patogenesi dei GIST (8, 13, 14).

2.1.2 Tipologia di trattamenti

La principale strategia terapeutica per i pazienti con GIST localizzato e non metastatico è rappresentata dalla resezione chirurgica (15).

In passato i GIST sono stati considerati tumori radio-resistenti quindi la radioterapia veniva raccomandata solo come cura palliativa in GIST metastatici(16). Negli ultimi tempi, ci sono state evidenze che le metastasi di GIST sono moderatamente sensibili alla radioterapia, con conseguente stabilizzazione di malattia per diversi mesi (17).

I tentativi di trattamento con chemioterapia per i GIST in stadio avanzato, sono risultati fallimentari nella quasi totalità dei casi. La refrattarietà alla chemioterapia sembra essere dovuta ad un'espressione elevata nei GIST della P-glicoproteina e all'attivazione dell'oncogene c-KIT che, attraverso l'aumento dei segnali antiapoptotici, conferisce resistenza alle terapie convenzionali (18, 19).

Il trattamento dei GIST è cambiato radicalmente con l'introduzione dell'inibitore tirosin-chinasico (TKi) Imatinib che, ad oggi, rappresenta il trattamento di prima linea per i GIST metastatici e può essere proposto anche come terapia adiuvante dopo la resezione chirurgica nei pazienti ad alto rischio di recidiva. Questo farmaco ha significativamente migliorato la prognosi dei pazienti GIST, prolungandone la sopravvivenza senza malattia dopo la chirurgia e anche la sopravvivenza globale per i casi di tumore metastatico (15). L'Imatinib è uno specifico competitore dell'ATP: si lega con elevata affinità al sito di legame delle chinasi, con conseguente inibizione del trasferimento dei gruppi fosfato dall'ATP ai residui di tirosina delle proteine coinvolte nella trasduzione del segnale (20, 21). Dati sperimentali e clinici dimostrano che l'Imatinib inibisce maggiormente KIT con mutazioni nell'esone 11 rispetto alle mutazioni nell'esone 9 o ai GIST wild-type (22).

2.1.3 Resistenza ad Imatinib e terapie a bersaglio molecolare di seconda e terza linea

Dopo un'iniziale risposta alla terapia con Imatinib, che può avere durata variabile, una quota rilevante di pazienti può comunque sviluppare resistenza e recidiva, con progressione di malattia (23).

La resistenza primaria ad Imatinib, ossia quella che si manifesta entro i primi 6 mesi di trattamento, colpisce il 15% dei pazienti; essa è correlata col genotipo, infatti pazienti con mutazioni nell'esone 11 o 9 del gene c-KIT o pazienti con GIST "wild-type" quindi privi delle comuni mutazioni, presentano una probabilità rispettivamente del 5%, 16% e 23% di sviluppare resistenza primaria (24).

I pazienti con resistenza secondaria sviluppano progressione di malattia dopo un'iniziale risposta all'Imatinib, principalmente a causa dello svilupparsi di nuove mutazioni secondarie nello stesso allele e nello stesso gene della mutazione primaria (23).

Tuttavia più di un terzo dei GIST che sviluppano resistenza secondaria non presentano mutazioni secondarie: il meccanismo di resistenza che si instaura in questi casi può essere dovuto ad un'amplificazione del gene c-KIT e ad attivazione per vie alternative delle chinasi (25).

Occasionalmente la resistenza ad Imatinib è associata alla perdita dell'espressione di KIT con conseguente attivazione dei pathways oncogenici in maniera indipendente da esso. Un esempio sono i "GIST dedifferenziati", definiti come tumori KIT positivi che progrediscono ad uno stadio anaplastico KIT negativo (25).

Recentemente questa variante dedifferenziata è stata osservata in pazienti che hanno ricevuto terapia con Imatinib per un periodo di tempo prolungato (26). Nel lavoro di Antonescu *et al.* (27) vengono descritti 8 casi di pazienti affetti da GIST dedifferenziato con fenotipo anaplastico KIT negativo. Gli autori affermano che il processo di dedifferenziamento possa verificarsi sia *de novo* sia come conseguenza a trattamento con Imatinib. Il processo di dedifferenziamento svolge un ruolo fondamentale nell'immortalità cellulare, causando resistenza alle terapie nei tumori recidivanti e metastatici (28, 29).

In caso di progressione di malattia (resistenza primaria o secondaria) viene indicato l'utilizzo di inibitori multi-chinasici come Sunitinib e Regorafenib, terapia di seconda e terza linea per pazienti GIST in stadio avanzato, rispettivamente (22). Sunitinib è un inibitore di c-KIT, di PDGFR α e del recettore del fattore di crescita endoteliale vascolare (VEGFR) e mostra una maggiore efficacia contro GIST mutati sull'esone 9 di c-KIT con un maggior tempo di sopravvivenza globale libera da recidiva. Sunitinib è efficace sui GIST che presentano mutazioni secondarie in c-KIT, in particolare quelle che colpiscono il sito di legame dell'ATP della chinasi; risulta invece relativamente inefficace contro i GIST che presentano mutazioni nel loop di attivazione dell'enzima (30-33).

Il Regorafenib è attualmente approvato come terza linea di trattamento nei pazienti che non rispondono alla terapia con Imatinib e Sunitinib. Anche in questo caso, il successo della terapia

sembra essere legato al genotipo dei GIST, in particolare dati preliminari ottenuti da un trial di fase II indicano che il regorafenib sia maggiormente efficace nei GIST che presentano mutazioni secondarie nel loop di attivazione di c-KIT (esone 17)(34).

Nuovi farmaci sono stati approvati dall'FDA per i GIST in stadio avanzato e metastatici: il Ripretinib e l'Avapritinib. Il Ripretinib è stato approvato come trattamento di quarta linea; attraverso il suo meccanismo d'azione che blocca simultaneamente la parte attivatoria e inibitoria della chinasi, risulta particolarmente attivo contro quei GIST che sviluppano resistenze secondarie. L'Avapritinib, invece, è l'unico farmaco approvato per i GIST che presentano la mutazione D842V in PDGFRA, nota per conferire resistenza a tutte le altre terapie con inibitori tirosin chinasi (35, 36).

Il successo ottenuto con Imatinib nel trattamento dei GIST non è stato comunque raggiunto con l'utilizzo dei farmaci di seconda e terza linea, probabilmente a causa dell'eterogeneità delle mutazioni secondarie di KIT che portano alla nascita di sottocloni di GIST resistenti (37-39).

La conoscenza dei GIST da un punto di vista molecolare e genetico ha dato la possibilità di attuare delle terapie di successo. Tuttavia le opzioni terapeutiche disponibili in questo momento sono limitate per tutti quei pazienti che sviluppano un quadro clinico di resistenza o che hanno ricadute di malattia. Questa prospettiva necessita lo sviluppo di ricerche traslazionali dedicate, con la generazione di modelli rappresentativi.

2.2 Immunoterapia nei tumori solidi

L'immunoterapia rappresenta un approccio innovativo e promettente per il trattamento dei tumori solidi e potrebbe rappresentare una prospettiva attraente per i pazienti affetti da GIST ma refrattari alle terapie convenzionali.

Ci sono sostanziali evidenze precliniche e cliniche che supportano il ruolo del sistema immunitario nei GIST, sottolineando l'importanza dello studio di nuove strategie immunoterapiche (40). I dati preclinici dimostrano che ci sia una connessione tra sistema immunitario e Imatinib e gettano le basi per un possibile sinergismo tra immunoterapia e inibitori tirosin-chinasi come approccio terapeutico vantaggioso per questi pazienti (41). Ci sono evidenze che l'Imatinib riduce l'espressione di IDO (indoleamina 2,3-diossigenasi), un enzima coinvolto nell'inibizione delle cellule T e delle cellule NK, portando ad attivazione dei linfociti T citotossici CD8⁺ (42, 43).

2.2.1 Immunoterapia con citochine

Le citochine sono utilizzate come approccio immunoterapico antitumorale da oltre tre decenni. L'obiettivo di questo tipo di immunoterapia è quello di indurre l'attivazione e la proliferazione dell'attività delle cellule T attraverso la segnalazione cellulare che porta ad una risposta antitumorale (44). L'interferone alpha (IFN α) è una citochina modulatrice della risposta immunitaria antivirale e antitumorale ed è stata studiata in diversi tipi di sarcoma, anche nei GIST come approccio alternativo per superare la resistenza ai farmaci TKis (45).

Alcuni dati preliminari ottenuti da un unico studio clinico condotto su pazienti GIST in stadio avanzato e refrattari a terapia, hanno evidenziato un effetto clinico sinergico tra Imatinib ed IFN α con un aumento intratumorale dei livelli di interferone gamma (IFN γ) in seguito a trattamento combinato, gettando così le basi per future investigazioni (46, 47).

2.2.2 Immunoterapia con inibitori dei checkpoints immunitari

L'immunoterapia con gli inibitori dei checkpoints immunitari (ICIs) si è dimostrata una strategia efficace per diversi tipi di tumori (48-50). I tumori sfruttano gli assi inibitori come PD-1/PD-L1 e PD-L2 o CTLA4 per eludere il sistema immunitario; l'inibizione di questo asse tramite ICIs può portare a remissioni durature in diversi tipi di tumore (51).

Per quanto riguarda l'asse del recettore PD1 con i suoi ligandi PD-L1/2, studi condotti su pazienti GIST hanno dimostrato un'espressione eterogenea di PD-L1 a livello tumorale, in particolare una maggiore espressione del ligando è stata osservata in tumori a basso rischio, mentre una minore espressione correla con un aumentato rischio di metastasi (42). L'asse PD1/PD-L1 ha un ruolo importante nel reclutamento delle cellule T "esauste" e nei meccanismi di evasione immunitaria da parte del tumore, infatti ci sono evidenze del fatto che il blocco di questo asse nei GIST non inibisca l'esaurimento funzionale dei linfociti T CD8⁺, potenziando così l'attività antitumorale dell'Imatinib (52).

Altre molecole target degli ICIs nei GIST possono essere CTLA-4 e TIM3/galectina-9. Studi preclinici e clinici hanno dimostrato un sinergismo positivo dalla combinazione terapeutica di Imatinib e terapia anti-CTLA4 (Ipilimumab e/o Dasatinib), imputabile al meccanismo di down-regolazione di IDO(53). Inoltre è stato osservato che il legame tra il recettore TIM3 espresso dalle cellule NK infiltranti i GIST e la galectina-9 espressa dalle cellule tumorali, può sopprimere l'attività delle cellule NK correlando con una ridotta immunità antitumorale adattativa mediata dalle cellule T

CD8⁺ nei tessuti GIST. Il blocco di questo asse può potenzialmente riattivare l'attività delle cellule NK e potrebbe essere utile per il trattamento per questo tipo di tumore (54).

2.2.3 Immunoterapia cellulare adottiva

L'immunoterapia cellulare adottiva prevede il trasferimento di linfociti antitumorali citotossici specifici o cellule natural killer (NK) che vengono espansi *ex vivo* per poi essere re-infusi nel paziente.

Nell'ambito dell'immunoterapia adottiva si sono dimostrate incoraggianti strategie basate sull'infusione di linfociti T infiltranti il tumore (TILs) nel contesto del melanoma (55). Tuttavia, nonostante questo approccio sia risultato incoraggiante, non è stato possibile applicarlo in modo altrettanto efficace in ambito clinico e in altri tipi di tumore.

Un approccio estremamente promettente consiste nella modificazione genetica dei linfociti convenzionali con lo scopo di portarli ad esprimere in membrana recettori (TCR) specifici per un dato antigene tumorale (55). Recenti dati riportano come pazienti affetti da sarcoma sinoviale, refrattari a trattamenti convenzionali, abbiano riportato una risposta clinica significativa se trattati con CTLs autologhi trasdotti con vettori esprimenti un TCR in grado di riconoscere l'antigene tumorale NY-ESO-1, espresso da circa l'80% dei sarcomi sinoviali insieme a circa il 25% dei melanomi (56).

Un limite dell'approccio con TCR è dato dalla necessità della presentazione antigenica da parte dell'HLA (Human Leukocyte Antigen), molecola molto spesso down-regolata nei tumori. Per superare questo limite una strategia ancora più promettente è data dall'utilizzo di linfociti T ingegnerizzati con i CAR (chimeric antigen receptor), i quali hanno recentemente dato risultati clinici eclatanti nell'ambito delle neoplasie ematologiche (57).

Questi importanti successi clinici, finora, non sono stati replicati contro i tumori solidi avanzati, dove le sfide cruciali sono l'identificazione di bersagli CAR esclusivi del tumore e il superamento delle barriere da parte del microambiente immunosoppressivo (57).

Nell'ambito dei GIST l'immunoterapia cellulare con i CAR è descritta in un lavoro condotto sia *in vitro* che *in vivo*, il quale fornisce dati incoraggianti per ulteriori investigazioni di carattere preclinico, dove si impiegano linfociti T redirezionati con il recettore antigenico chimerico (CAR) anti-KIT, capace di attività litica contro cellule tumorali di GIST e di produzione a livello tumorale di IFN γ (58).

Tra le varie forme di immunoterapia cellulare possibili si collocano anche le cellule killer indotte da citochine (CIK) dotate di attività antitumorale indipendente dall'HLA e con caratteristiche biologiche importanti quali grande espandibilità, buona persistenza *in vivo*, nonché intensa attività antitumorale (59).

Studi clinici hanno mostrato che l'immunoterapia adottiva con questo particolare tipo di linfociti generati *ex vivo* è ben tollerata e può avere efficacia maggiore della chemioterapia contro neoplasie solide ed ematologiche. Numerosi studi *in vitro* hanno confermato l'abilità delle CIK di uccidere efficacemente vari tipi di tumori solidi, comprese cellule resistenti ai farmaci (59). Le CIK sono cellule con un fenotipo T-NK caratterizzate da facile espandibilità e buona persistenza *in vivo*. Sono generate a partire da cellule mononucleate di sangue periferico e attivate ed espanse *ex vivo* con l'aggiunta di IFN γ , anticorpo anti-CD3 e IL-2 ad alte dosi (60, 61) e sono capaci di un'intensa attività antitumorale indipendente dal complesso MHC.

L'attività antitumorale delle CIK è dovuta principalmente alla frazione CD3⁺CD56⁺; le cellule CD3⁺CD56⁻ sono più simili ai linfociti T convenzionali. Le CIK esprimono alcuni recettori delle cellule Natural Killer (NK) come NKG2D, DNAM-1 e Nkp30. Il principale meccanismo antitumorale delle CIK risiede nell'interazione del recettore NKG2D con proteine stress-inducibili presenti sulle cellule tumorali, quali MIC A/B e ULBPs (61, 62). Mentre NKG2D media l'interazione tra le CIK e i bersagli tumorali, l'effetto citolitico finale è mediato dalle perforine e dai granzimi (61). Le CIK rilasciano diverse citochine fra cui IFN γ e fattore necrotico tumorale α (TNF α), i quali sono coinvolti nella regolazione dell'immunità innata e adattativa. Altre citochine regolatorie secrete sono IL-2 e IL-4 (63). Le CIK sono una potenziale valida alternativa all'immunoterapia convenzionale con linfociti T citotossici grazie alla loro intensa attività antitumorale HLA-indipendente, dimostrata contro diversi tipi di tumori solidi ed ematologici (64). Inoltre l'attività antitumorale delle CIK può essere aumentata modificandole geneticamente al fine di esprimere i CAR, recettori chimerici capaci di riconoscere uno specifico target tumorale portando all'eliminazione specifica dei bersagli (65).

Una strategia di immunoterapia adottiva riveste quindi un ruolo promettente e merita ricerche dedicate per una possibile azione diretta antitumorale, ma anche indiretta mediata dall'intensa produzione citochinica.

Nell'ambito dell'immunoterapia adottiva esistono altri effettori naturalmente presenti nel sistema immunitario, come le cellule Natural Killer (NK), capaci di eliminare il target tumorale senza restrizioni MHC (66). In numerosi studi è stata dimostrata l'attività antitumorale di queste cellule anche a livello clinico, con l'infusione adottiva in pazienti affetti da neoplasie solide ed

ematologiche (67). Tuttavia, rimane una sfida ottenere un numero adeguato di cellule NK primarie per le infusioni nei pazienti e, inoltre, il recupero di cellule vitali dopo crioconservazione non è ottimale (68). Questi limiti sono parzialmente superabili con l'utilizzo di linee cellulari quali NK-92, linea ottenuta e stabilizzata dal sangue periferico di pazienti affetti da linfoma non-Hodgkin. Le NK-92 sono cellule dipendenti da interleuchina-2 e sono facilmente reperibili dalle banche cellulari. Sono caratterizzate da una elevata espandibilità e da una significativa attività antitumorale, visibile anche dopo 48h (68).

Il campo dell'immunoterapia cellulare adottiva con cellule CIK e linee cellulari NK-92 offre ampie opportunità e merita di essere approfondito per lo sviluppo di terapie efficaci per questo tipo di tumore.

SCOPO DEL LAVORO

Lo scopo di questo progetto è stato quello di generare un modello preclinico di GIST negativi per mutazioni di c-KIT/PDGFR α (wild-type) che riflettesse lo scenario clinico di resistenza alle terapie convenzionali, consentendo l'esplorazione funzionale di nuove strategie terapeutiche, in particolare di tipo immunoterapico. La piattaforma sperimentale si è basata su linee cellulari tumorali primarie, generate da biopsie chirurgiche di pazienti con diagnosi di GIST afferenti al nostro Centro. Il disegno sperimentale si è sviluppato ed articolato nei seguenti obiettivi specifici:

- Generazione e caratterizzazione di linee primarie derivate da GIST wild-type;
- Studio della sensibilità delle linee derivate da GIST wild-type a farmaci a bersaglio molecolare utilizzati in pratica clinica;
- Studio del potenziale ruolo antitumorale e immunomodulatorio di IFN α / γ contro linee GIST wild-type e possibile sinergismo con farmaci a bersaglio molecolare;
- Studio in vitro dell'attività antitumorale di linfociti killer CIK derivati da pazienti, ed NK-92 contro linee di GIST wild-type.

3. MATERIALI E METODI

3.1 Pazienti

Nel nostro studio abbiamo utilizzato materiale biologico, sangue e cellule tumorali generati da pazienti con diagnosi di GIST. La nostra coorte è costituita da 38 pazienti afferenti al nostro Istituto. Tutti i pazienti hanno firmato un consenso informato per il trattamento dei dati, il prelievo e l'utilizzo di materiale biologico a scopo di ricerca, approvato dal comitato etico.

I campioni chirurgici prelevati in sede operatoria sono stati sottoposti ad analisi mutazionale del gene c-KIT (esoni 9, 10, 11, 13 e 17) e PDGFRA (esoni 12, 14 e 18).

3.2 Coltura di linee cellulari primarie di GIST wild-type

Le 11 linee cellulari primarie di GIST (wtGIST) sono state generate nel nostro laboratorio a partire da pezzi biotici prelevati in sede operatoria. Le sospensioni cellulari sono state ottenute mediante disgregazione meccanica del pezzo biotico con un bisturi sterile e successiva digestione enzimatica con 200 U/ml di Collagenasi di tipo I (Invitrogen) o con lo strumento gentleMACS (Miltenyi Biotec) attraverso l'utilizzo dell'apposito kit (tumor dissociation kit, human, Miltenyi Biotec). Le cellule sono state poste in coltura con terreno IMDM (Sigma Aldrich) addizionato con 15% Siero bovino fetale (FBS) (Euroclone S.p.A.), penicillina 100 U/ml e streptomicina 100 µg/ml (Sigma Aldrich) e L-glutamina 2mM (Sigma Aldrich) in piastre trattate per le colture cellulari (Corning/Costar, VWR International PBI Srl).

Le linee wtGIST sono state mantenute in incubatore alle condizioni standard di 37°C e 5% CO₂.

Le cellule tumorali ottenute sono state sottoposte ad analisi mutazionale del gene c-KIT (esoni 9, 10, 11, 13 e 17) e PDGFRA (esoni 12, 14 e 18) per confermare la conformità con il tumore di origine.

3.3 Tumorigenicità delle linee wtGIST

Sono stati condotti saggi *in vivo* per confermare la tumorigenicità delle colture tumorali di GIST. Sono stati utilizzati topi NOD/SCID (Laboratories Charles River). Gli animali sono stati inoculati sottocute con 1×10^6 cellule tumorali risospese in 200 µL di PBS1x sterile e 50% di Matrigel senza fattori (Sigma Aldrich). Prima di effettuare l'iniezione sottocutanea nella parte superiore della

coscia sinistra, i topi sono stati sottoposti ad anestesia gassosa attraverso l'uso di una miscela costituita da O₂, NO₂ ed Isoflurano. La crescita del tumore è stata monitorata settimanalmente mediante misurazione con calibro. I topi sono stati sacrificati al raggiungimento dei 2 cm del diametro massimo del tumore o in caso di tossicità grave e le sezioni istologiche ottenute dai tumori sottoposte al parere di un anatomopatologo. Il tempo di osservazione massimo per la comparsa di tumore è stato di 6 mesi.

3.4 Sensibilità a Imatinib e Sunitinib delle linee wtGIST

Le cellule tumorali sono state poste in coltura in piastre da 96 pozzetti (Corning, New York, USA) ed esposte dopo 24h a concentrazioni scalari di Imatinib (Selleckem, Houston USA), da 0,025 µM a 25 µM, oppure di Sunitinib (Selleckem, Houston USA), da 0,1 µM a 15 µM. La dose IC50 è stata fissata per valori di lisi cellulare tra il 40% ed il 60%. Come controllo sono state piastrate cellule tumorali in solo terreno di coltura. Il tempo di esposizione è stato di 72h a 37°C, 5% CO₂. Al termine si è eseguito un saggio in luminescenza che misura la vitalità cellulare in base al rilascio di ATP (Cell Titer Glo, Promega, Wisconsin, USA). Si è aggiunto a ciascun pozzetto, al buio, un volume di reagente Cell Titer Glo (100 µl), preparato in accordo con le condizioni riportate sul prodotto, pari al volume presente in ogni pozzetto (100 µl). In seguito, sempre al buio, la piastra è stata posta per 2 minuti in agitazione per indurre la lisi e successivamente lasciata per 10 minuti a temperatura ambiente per stabilizzare il segnale di luminescenza. Infine è stato rilevato il segnale di luminescenza utilizzando un lettore di micropiastre (Muti-Mode microplate Readers Biotek) gestito dal software GEN5 1.9.

3.5 Sensibilità ad IFN α e IFN γ di linee wtGIST

La sensibilità agli interferoni delle cellule tumorali è stata valutata tramite saggio bioluminescente e tramite conteggio in vitale. Per il saggio bioluminescente le cellule tumorali sono state coltivate in piastre da 96 pozzetti (in triplicato) e trattate dopo 24h con IFN α (1x10⁴ IU/mL, Myltenyi Biotec) e IFN γ (1x10³ IU/mL, Peprotech) per 72h a 37°C 5% CO₂. Attraverso l'utilizzo di Cell Titer Glo (Promega) è possibile quantificare l'ATP rilasciata dalle cellule vive e metabolicamente attive. Il segnale di luminescenza è stato rilevato utilizzando un lettore di piastre (Muti-Mode microplate Readers Biotek).

Per il conteggio in vitale con Blu Tripiano (Sigma Aldrich) le cellule tumorali sono state piastrate in multiwell da 6 pozzetti e trattate dopo 24h con IFN α e IFN γ per 72h a 37°C 5% CO₂.

Successivamente sono state staccate con Accutase (Gibco BRL), lavate con PBS 1x (Sigma Aldrich), diluite con Blu Tripiano e contate con la camera di Burker.

Tutti i dati sono stati normalizzati sui rispettivi controlli non trattati. Sono state considerate sensibili le colture cellulari con una mortalità maggiore del 20%, resistenti quelle con morte cellulare inferiore al 20%. Le colture trattate in pozzetti da 6 sono state utilizzate oltre che per calcolare la tossicità degli INFs anche per valutare l'effetto immunomodulatorio, tramite colorazione citofluorimetrica come descritto nei paragrafi precedenti.

3.6 Combinazione terapeutica di IFNs con i farmaci a bersaglio molecolare

Le cellule tumorali sono state messe in coltura ed esposte ai diversi trattamenti dopo 24h per 72h a 37°C 5% CO₂. Le cellule tumorali sono state piastrate e trattate in multiwell da 6 pozzetti per valutare eventuali cambiamenti nell'espressione dei ligandi di superficie tramite successive analisi citofluorimetriche, e in piastre da 96 pozzetti per eseguire il test di vitalità in bioluminescenza con il Cell Titer Glo.

L'Imatinib è stato utilizzato a dosi terapeutiche (25 nM) o dosi IC₅₀ e il Sunitinib a dosi IC₅₀, entrambi in monoterapia o in combinazione con l'IFN α (1x10⁴ U/mL) o l'IFN γ (1x10³ U/mL). Tutti i dati sono normalizzati rispetto ai corrispettivi controlli non trattati.

3.7 Analisi fenotipica delle linee wtGIST

Per poter marcare le cellule e poterle acquisire al citofluorimetro, le cellule sono state staccate con Accutase (Gibco BRL, Grand Island, NY), lavate con PBS 1x (Sigma Aldrich, Missouri, USA) e incubate per 30 minuti a 4°C con anticorpi murini monoclonali. Quando necessario è stato aggiunto un anticorpo secondario prima dell'acquisizione al citofluorimetro (CyAN ADP, Beckman Coulter s.r.l.), con successiva aggiunta di DAPI (Thermo Scientific) come marcatore di mortalità. I dati ottenuti sono stati analizzati con il software Summit 5.0. Le colture GIST sono state valutate tramite analisi citofluorimetrica per l'espressione in membrana di varie molecole (PD-L1, PD-L2, β 2 microglobulina e HLA-ABC), tra cui i ligandi delle CIK (MICA/B, ULBP1, ULBP2, 5, 6, ULBP3, CD112 e CD155). Sono stati utilizzati i seguenti anticorpi monoclonali: Anti-Human MICA/B (PE, Pharmingen), Anti-Human ULBP1 (PE, R&D System), Anti-Human ULBP2, 5, 6 (APC, R&D System), Anti-Human ULBP3 (FITC, R&D System), Anti-Human CD112 (PE, R&D System), Anti-Human CD155 (FITC, R&D System), Anti-Human PD-L1 (PE, Pharmingen), Anti-Human PD-L2 (APC, Pharmingen),

β 2 microglobulina (riconosciuta da un Ab secondario, Goat Anti-Mouse Ig PE o APC, Pharmigen) e Anti-Human HLA-ABC (PE, Miltenyi Biotec).

3.8 Valutazione dei recettori di IFNs in linee wtGIST tramite citofluorimetria e Real-Time PCR

La presenza della subunità R1 dei recettori dell'IFN α e dell'IFN γ è stata valutata tramite citofluorimetria (CyAN ADP, Beckman Coulter s.r.l.) utilizzando i seguenti anticorpi monoclonali: Human IFN- α/β R1 Antibody e Human IFN- γ R1/CD119 Antibody (R&D Systems), detectati con l'utilizzo di un anticorpo secondario Goat Anti-Mouse Ig APC (Pharmigen). I dati ottenuti sono stati analizzati con il software Summit 5.0.

L'RNA messaggero (mRNA) è stato estratto dalle cellule tumorali e dai PBMC (cellule mononucleate di sangue periferico utilizzate come controllo) attraverso una procedura di purificazione che prevede l'utilizzo del kit di estrazione Maxwell RSC miRNA Tissue Kit (Promega), seguendo le istruzioni fornite dal produttore. Successivamente i campioni preparati sono stati posti all'interno dello strumento Maxwell RSC Instrument (Promega) per procedere con l'estrazione automatica.

L'mRNA estratto è stato retrotrascritto in cDNA mediante High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit (Applied Biosystems by Thermo Fisher Scientific). È stata poi valutata la concentrazione tramite spettrofotometro Nanodrop (The DeNovix DS-11 FX Series). I cDNA ottenuti sono stati amplificati e quantificati tramite real time PCR quantitativa (qRT-PCR), utilizzando primers specifici per la subunità R1 dei recettori dell'IFN α e dell'IFN γ . Allo stesso modo sono stati amplificati e quantificati tre geni housekeeping (GAPDH, hPGK e HPRT), utilizzando primers specifici, per poter paragonare la quantità di mRNA dei geni d'interesse con i geni di controllo. Come intercalante fluorescente del DNA è stato utilizzato il SYBR Green (Advanced Universal SYBR Green Master Mix, Biorad).

L'analisi dei dati è stata condotta confrontando i valori di espressione dei geni delle diverse colture cellulari tumorali con quelli dei PBMC derivati da pazienti; tutti i valori sono stati normalizzati sulla quantità di mRNA dei tre geni housekeeping.

I livelli di concentrazione dell'mRNA sono stati calcolati utilizzando il metodo $\Delta\Delta$ Ct e sono indicati in termini di fold change.

3.9 Produzione di VEGF *in vitro*

Le cellule tumorali sono state messe in coltura in piastre da 48 pozzetti (Corning) con terreno di coltura IMDM (Sigma Aldrich) addizionato con 15% Siero bovino fetale (FBS) (Euroclone S.p.A.), penicillina 100 U/ml e streptomina 100 µg/ml (Gibco BRL) e L-glutamina 2 mM (Sigma Aldrich) in un volume finale di 500µl e incubate a 37°C per 72h. Il surnatante cellulare è stato recuperato e successivamente centrifugato per eliminare eventuali frammenti cellulari. La concentrazione di VEGF è stata misurata utilizzando Bio-Plex Pro™ Human Cytokine VEGF Set (Biorad), in duplicato strumentale, secondo le indicazioni del produttore. I dati acquisiti sono stati analizzati da Bioclarma (Analysis Service).

3.10 Espansione *ex vivo* delle CIK di paziente

Le CIK sono state generate a partire da PBMC freschi e congelati generati da pazienti affetti da GIST. I PBMC sono stati isolati da sangue intero attraverso centrifugazione in gradiente di densità (Lymphoprep, Sentinel Diagnostic) e messi in coltura a 37°C e 5% di CO₂, in fiasche da 25 cm² o 75 cm² (Corning) alla concentrazione di 1,5×10⁶/mL in RPMI (Gibco BRL) addizionato con 10% FBS (Gibco BRL), IFN-γ 10³ IU/mL (Peprotech), Penicillina 100 IU/mL, Streptomina 100 µg/mL e L-glutamina 2 mM (Sigma Aldrich). Dopo 18-24 ore di coltura sono stati aggiunti Ab anti-CD3 50 ng/mL e IL-2 300 IU/mL (entrambi MACS Miltenyi Biotec). Ogni 3-4 giorni sono stati aggiunti nuovo terreno fresco e IL-2. L'espansione, l'analisi immunofenotipica e l'attività antitumorale sono state valutate al termine della maturazione delle CIK, dopo 3-4 settimane di coltura. I valori di espansione rispetto ai livelli basali sono stati espressi come "fold", ottenuti dividendo il numero di cellule alla fine della coltura per il numero di cellule al livello basale.

3.11 Analisi fenotipica delle CIK

I campioni cellulari (105 cellule) sono stati incubati con anticorpi monoclonali murini per 30 minuti al buio, a 4°C, acquisiti al citofluorimetro, aggiungendo DAPI come marcatore di mortalità, ed analizzati con il software Summit 5.0. Le cellule sono state analizzate per l'espressione dei recettori CD3 (Anti-Human CD3 FITC e APC, Pharmingen), CD8 (Anti-Human CD8 PE, MACS Miltenyi Biotec), CD56 (Anti-Human CD56 APC, MACS Miltenyi Biotec), NKG2D (Anti-Human CD314 APC, MACS Miltenyi Biotec), DNAM-1 (Anti-Human CD226 PE, BD Biosciences), CD62L (Anti-Human CD62L PE, MACS Miltenyi Biotec), CD45RA (Anti-Human CD45RA FITC, MACS Miltenyi Biotec), PD-1 (Anti-Human CD 279 APC, MACS Miltenyi Biotec), TIM3 (Anti-TIM3 APC, MACS Miltenyi Biotec),

LAG3 (Anti-Human CD223 BV421 Violet1, BD Biosciences), TIGIT (Anti-Human TIGIT PerCP-eFluor 710, eBiosciences), NKp30 (Anti-CD 337 PE-Vio770, MACS Miltenyi Biotec), NKp44 (Anti-CD336 VioBright FITC, MACS Miltenyi Biotec), NKp46 (Anti-CD335 PE-Vio615, MACS Miltenyi Biotec).

3.12 Attività citotossica *in vitro* delle CIK

L'attività antitumorale delle CIK generate dai pazienti è stata valutata attraverso saggi di citotossicità *in vitro* contro colture GIST. Per i saggi da analizzare in citofluorimetria le cellule bersaglio sono state marcate con il colorante vitale PKH26 Red Fluorescent Cell Linker (Sigma Aldrich), in accordo con le indicazioni riportate sul prodotto, e incubate con le CIK in piastre da 48 pozzetti (Corning) per 72h. Le cellule sono state divise nei pozzetti in concentrazioni note e rapporti effettore/bersaglio progressivamente decrescenti (10:1, 5:1, 2,5:1 e 1:1), in un volume finale per ciascun pozzetto di 500 µl di terreno addizionato con IL-2 ad una concentrazione finale di 500 IU/mL. Come controllo di mortalità spontanea, sono stati piastrati dei pozzetti di controllo con solo i bersagli marcati e con le CIK da sole. I risultati sono stati analizzati tramite citofluorimetro, aggiungendo DAPI come marcatore di mortalità, e misurando la percentuale di lisi delle cellule target marcate con PKH26. Parallelamente, l'attività citotossica delle CIK è stata anche valutata attraverso saggi in bioluminescenza con Cell Titer Glo. Sono stati mantenuti gli stessi rapporti effettore/bersaglio, non è stata effettuata una colorazione con PKH26 e le cellule sono state poste in piastre da 96 pozzetti, in triplicato per ciascuna condizione, in un volume finale per ciascun pozzetto di 100 µl di terreno addizionato con IL-2 ad una concentrazione finale di 300 IU/mL. Anche in questo caso come controllo sono stati dedicati dei pozzetti alla coltura dei soli bersagli e dei soli effettori. Le piastre sono state poste ad incubare per 72h a 37°C e 5% CO₂ prima dell'analisi.

3.13 Linea cellulare NK-92 e attività citotossica *in vitro*

La linea cellulare NK-92 deriva da cellule mononucleate del sangue periferico di pazienti affetti da linfoma non-Hodgkin in rapida progressione ed è una linea cellulare dipendente da interleuchina-2. Le NK-92 sono state coltivate in fiasche (Corning) ad una concentrazione di 2×10^5 cellule/mL in Alpha Minimum Essential medium (α -MEM) con l'aggiunta di 12.5% FBS (Gibco BRL), 12.5% horse serum (HS, Gibco), Penicillina 100 IU/mL, Streptomina 100 µg/mL, L-glutamina 2 mM (Sigma Aldrich) e IL-2 100 U/mL (Miltenyi Biotec).

Per testare l'attività citotossica *in vitro* delle NK-92 verso le nostre colture primarie di GIST, le cellule bersaglio sono state marcate con il colorante vitale PKH26 Red Fluorescent Cell Linker (Sigma Aldrich), in accordo con le indicazioni riportate sul prodotto, e incubate con le NK-92 in piastre da 48 pozzetti (Corning) per 48h a 37°C e 5% CO₂. Le cellule tumorali sono state divise nei pozzetti in concentrazioni note e rapporti effettore/bersaglio progressivamente decrescenti (2:1, 1:1, 1:2, 1:4, 1:8, 1:16 e 1:32), in un volume finale per ciascun pozzetto di 500 µl di terreno α-MEM addizionato con IL-2 ad una concentrazione finale di 100 IU/mL. I test sono stati acquisiti tramite citofluorimetro, aggiungendo DAPI come marcatore di mortalità, e misurando la percentuale di lisi delle cellule target marcate con PKH26.

Parallelamente, l'attività citotossica delle NK-92 è stata anche valutata attraverso saggi in bioluminescenza con Cell Titer Glo, il test è stato piastrato con gli stessi criteri del precedente ma in piastre da 96 pozzetti in un volume finale di 100 µl per pozzetto (in triplicato per ogni condizione) e poi acquisito dopo 48h. Il segnale di luminescenza è stato rilevato utilizzando un lettore di micropiastre (Muti-Mode microplate Readers Biotek). Come controllo di mortalità spontanea, sono stati piastrati dei pozzetti di controllo con solo i bersagli e con le NK-92 da sole.

3.14 Analisi statistica

I dati ottenuti dalla caratterizzazione delle cellule CIK e delle colture di GIST (fenotipo, sensibilità a farmaci bersaglio molecolare e IFNs, espressione dei recettori degli IFNs) sono stati espressi o come valori mediani con i rispettivi intervalli, oppure come media ± SEM. I dati relativi l'effetto immunomodulatorio di IFNs su PD-1/2, HLA-I e β2 Microglobulina sono stati analizzati con il test di Wilcoxon o il test Mann-Whitney. Per valutare le curve relative l'attività citotossica *in vitro* delle cellule CIK e delle NK-92 sono state svolte analisi della varianza two-way ANOVA. I dati sono stati analizzati con software Prism GraphPad 8.1.2 e i valori sono stati considerati come significativi per $p < 0.05$.

4. RISULTATI

4.1 Generazione di linee primarie derivate da pazienti affetti da GIST wild-type

Il nostro modello preclinico si basa sulla generazione di linee primarie derivate da pazienti con diagnosi di GIST wild-type. In particolare il nostro obiettivo era quello di generare delle linee primarie che fossero rappresentative di un quadro clinico caratterizzato da assenza di mutazioni con conseguente resistenza alle terapie convenzionali. Per mettere a punto il nostro modello sperimentale, siamo partiti da una coorte di 38 pazienti con diagnosi di GIST afferenti al nostro istituto, 14 con malattia avanzata e 24 con malattia localizzata.

L'analisi mutazionale eseguita al momento della diagnosi di malattia ha evidenziato mutazioni in c-KIT e PDGFRA (n=33, 87%) o nessuna mutazione (n=5, 13%).

Di 38 pazienti, 25 (presentanti mutazioni in c-KIT o PDGFRA all'esordio di malattia) sono stati sottoposti ad almeno una linea di trattamento neoadiuvante con Imatinib e/o Sunitinib prima della resezione chirurgica. L'analisi mutazionale su campione chirurgico ha mostrato che 12/25 presentavano la stessa mutazione evidenziata all'esordio di malattia (media mesi trattamento: 9), mentre 13/25 non presentavano più mutazioni, diventando quindi classificabili come wild-type (media mesi trattamento: 26).

I restanti 13/38 non hanno effettuato terapia neoadiuvante e al momento della resezione chirurgica hanno mantenuto le stesse caratteristiche mutazionali dell'esordio di malattia (5 wild-type e 8 mutati in c-KIT/PDGFRA).

Quindi 18 campioni chirurgici su 38 sono risultati wild-type, 5 privi di mutazioni sia ad esordio che alla chirurgia, mentre 13 mutati ad esordio sono risultati wild-type alla chirurgia, dopo trattamento neoadiuvante prolungato.

Dai 18 campioni chirurgici wild-type sono state generate linee cellulari primarie (n=11). Anche le linee cellulari primarie ottenute sono state sottoposte ad analisi mutazionale, confermando l'assenza di mutazioni come il pezzo da cui sono state generate e classificabili quindi come wild-type (linee wtGIST) (Tabella 1).

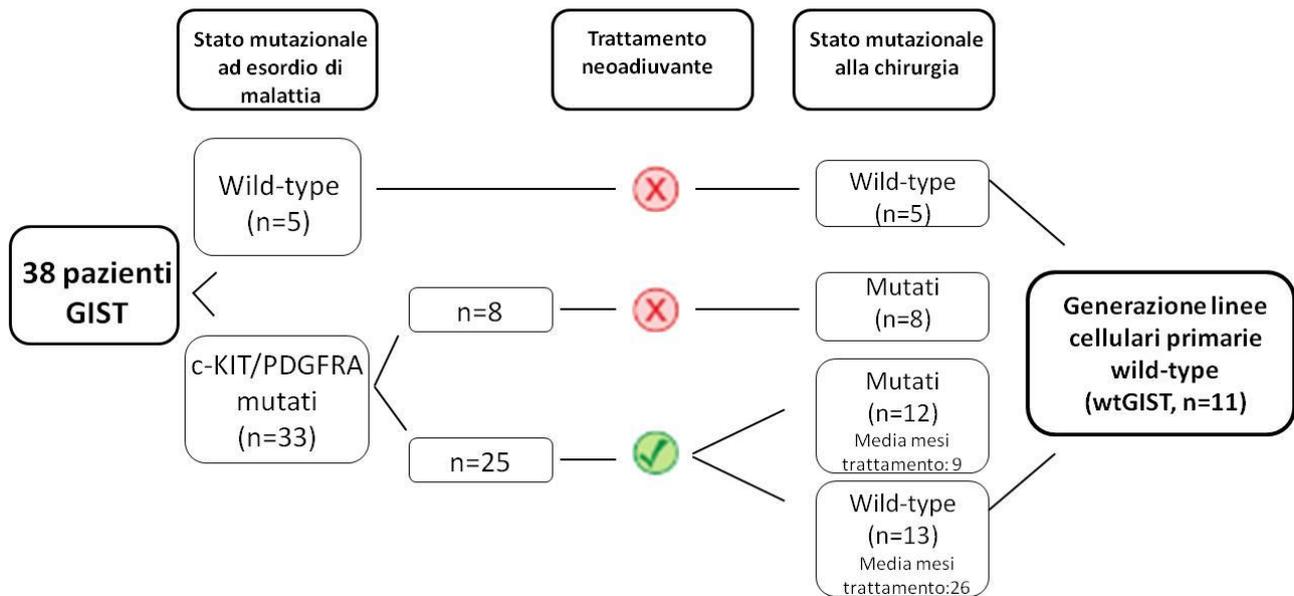


Tabella 1. Schema riassuntivo della coorte di pazienti GIST che costituiscono la piattaforma sperimentale.

Con lo scopo di confermare la tumorigenicità delle nostre colture, ad oggi sono state tutte inoculate *in vivo* in topi NOD/SCID e 7 di queste hanno generato tumore, con un tempo di attecchimento medio di 5 settimane a partire dall'inoculo. Solo 4 colture delle 11 non sono risultate tumorigeniche raggiungendo il tempo di osservazione massimo (sei mesi) senza comparsa di tumore.

4.2 Sensibilità a farmaci a bersaglio molecolare di linee wtGIST

È stata valutata *in vitro* la sensibilità delle linee wtGIST ai farmaci a bersaglio molecolare Imatinib e Sunitinib, attualmente di uso clinico nei pazienti GIST come trattamenti di prima e seconda linea, rispettivamente. Lo scopo di tali saggi funzionali era quello di confermare indirettamente e funzionalmente l'assenza della mutazione sul gene c-KIT, simulando *in vitro* le condizioni di trattamento proprie di questo contesto nella pratica clinica.

I saggi di sopravvivenza hanno mostrato che tutte le linee wtGIST testate (n=11), così come ci si attenderebbe in un analogo contesto clinico, sono resistenti all'azione dell'Imatinib (n=20, Fig. 1 A) con una IC50 media di 17 μ M (SEM 1,4) e parzialmente sensibili al Sunitinib (n=37, Fig. 1 B) con una IC50 media di 6 μ M (SEM 0,2).

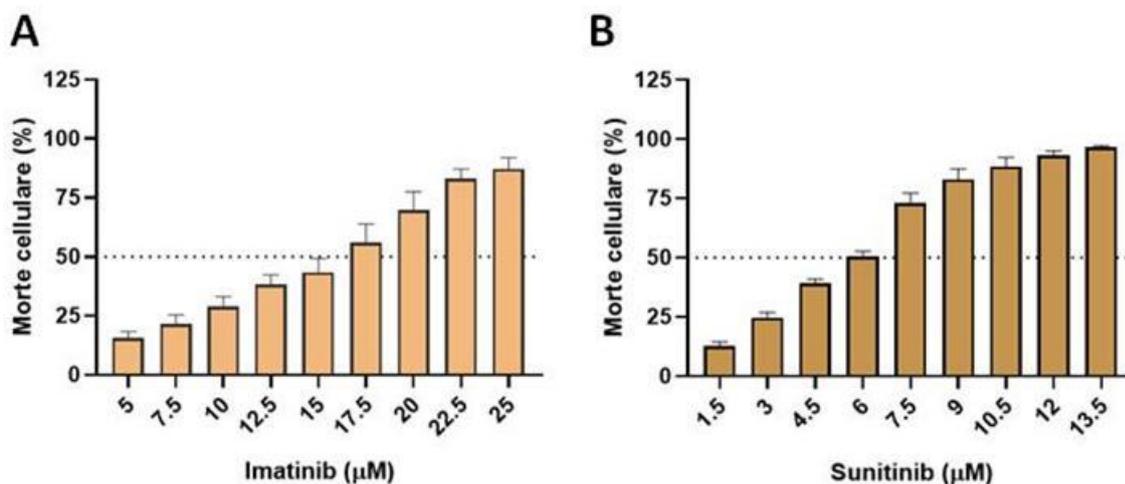


Figura 1. Sensibilità di linee wtGIST a terapia a bersaglio molecolare

A) Le linee wtGIST sono resistenti all'azione dell'Imatinib (IC50 media $17\mu\text{M}\pm 1,4$, media \pm SEM);

B) Le linee wtGIST sono parzialmente sensibili a Sunitinib (IC50 media $6\mu\text{M}\pm 0,2$, media \pm SEM).

4.3 Potenziale ruolo terapeutico e modulatore di IFN α e IFN γ in linee wtGIST

L'interferone può esercitare azioni antitumorali dirette, ma anche importanti azioni modulatorie e sinergiche con altre strategie immunoterapiche. Nel nostro modello *in vitro* abbiamo esplorato in maniera focalizzata queste componenti nei confronti di linee tumorali derivate da GIST WT.

4.3.1 Attività antitumorale diretta di IFN α e IFN γ

In esperimenti selezionati è stata valutata *in vitro* l'attività antitumorale diretta di IFN α (n=11, 1×10^4 IU/ml) e IFN γ (n=20, 1×10^3 IU/ml) su linee wtGIST (n=8, Fig.2). Considerando sensibili le linee con percentuali di mortalità superiori al 20%, in seguito a trattamento di 72h, 4/8 (50%) delle linee wtGIST sono risultate sensibili all'azione dell' IFN α con una mortalità del $42\%\pm 9$ (media \pm SEM) mentre il restante 50% è risultato resistente con mortalità dell' $8\%\pm 4$ (media \pm SEM, n=20). Tutte le linee wtGIST testate (8/8, 100%) sono risultate resistenti all'azione citotossica diretta dell'IFN γ con una mortalità cellulare del $6\%\pm 2,5$ (media \pm SEM, n=20, Fig. 2).

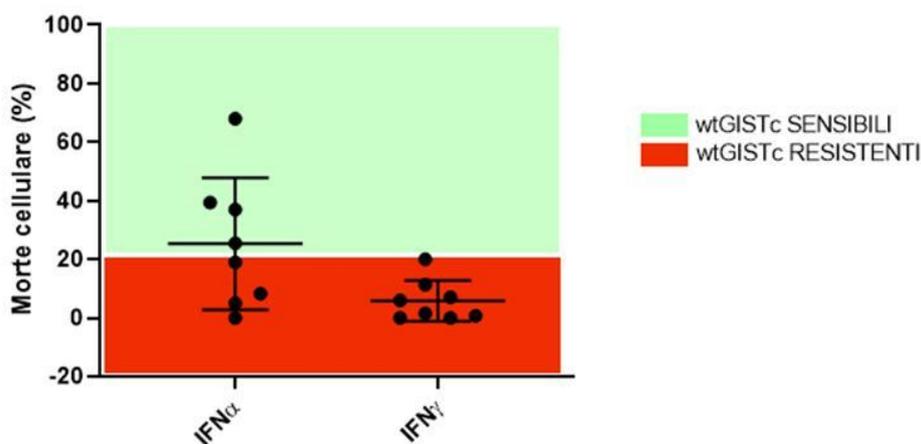


Figura 2. Sensibilità di linee wtGIST ad IFN α e IFN γ

La mortalità cellulare post trattamento è stata calcolata rispetto a quella dei controlli non trattati. Quattro linee su otto sono risultate sensibili all'azione di IFN α (metà verde del grafico), mentre quattro resistenti. Tutte le linee wtGIST sono invece risultate resistenti all'azione di IFN γ (metà rossa del grafico).

4.3.2 Attività immunomodulatoria indiretta di IFN α e IFN γ

Parallelamente all'attività antitumorale diretta è stata esplorata anche la capacità immunomodulatoria degli IFNs, valutando le variazioni di espressione a livello delle linee wtGIST (n=8) di importanti molecole di membrana con funzione immunoregulatoria, quali i checkpoints inibitori PD-L1/2, e le molecole HLA-I e β 2-microglobulina fondamentali per la corretta presentazione antigenica. L'effetto di una modulazione a tali livelli potrebbe essere indirettamente indicativo della relativa resistenza o suscettibilità di tali bersagli GIST ad una risposta immunitaria adattativa, e comunque presupposto per l'esplorazione di possibili sinergismi con strategie più complesse come i checkpoint inhibitors attualmente in uso in vari ambiti clinici.

Dal punto di vista sperimentale, abbiamo condotto analisi *in vitro*, dopo trattamenti di 72h con IFN α (1×10^4 IU/ml) e IFN γ (1×10^3 IU/ml).

Il trattamento con IFN α e IFN γ (n=19) ha determinato un aumento significativo dell'espressione di membrana di PD-L1 (media \pm SEM: IFN α 57% \pm 7 e IFN γ 67% \pm 7,4 rispetto al corrispettivo controllo non trattato 38% \pm 7,3) (Fig. 3 A) a livello dei GIST trattati, con un incremento medio di 2,4 e 2,1 fold (Fig. 3 B), rispettivamente.

In maniera analoga si è osservato un aumento significativo anche di PD-L2 (IFN α 40% \pm 8,2 e IFN γ 55% \pm 6,1 rispetto al 28% \pm 5,9 del non trattato, media \pm SEM) (Fig. 3 C), con un incremento medio della percentuale di espressione di 2,1 e 4,7 fold, rispettivamente dopo trattamento con IFN α (n=19) e IFN γ (n=24) (Fig. 3 D).

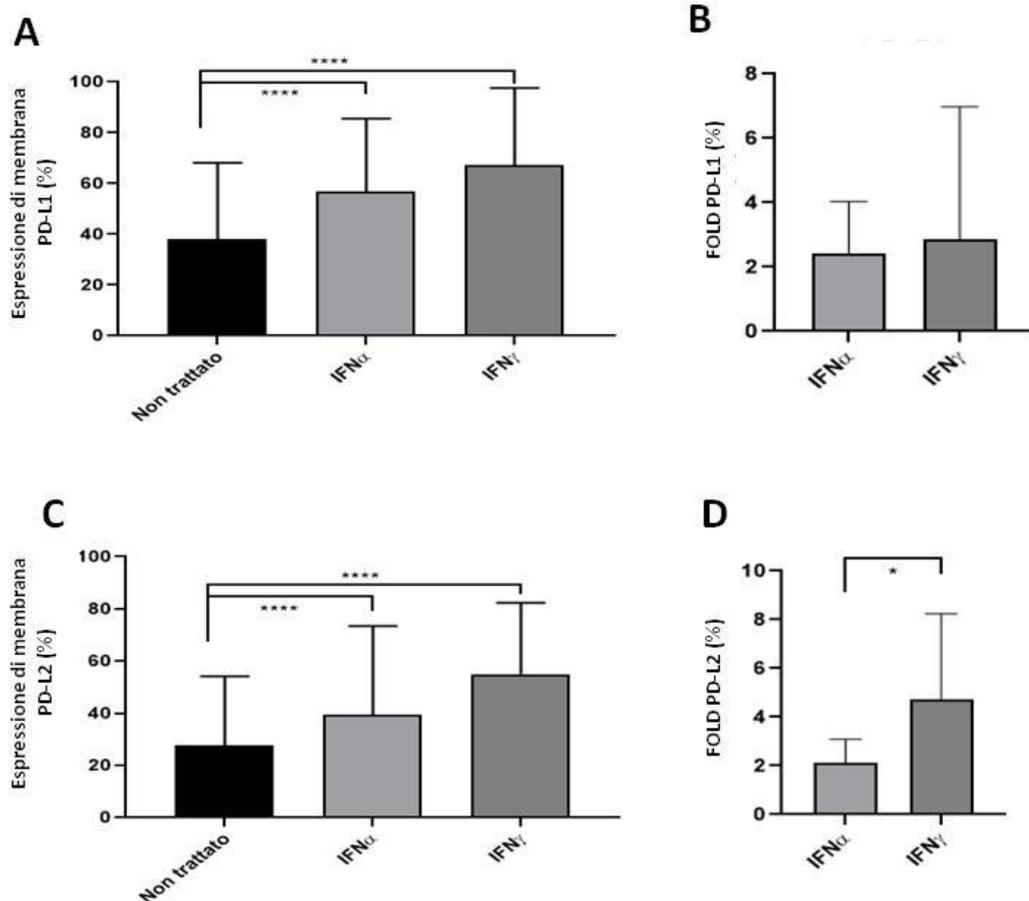


Figura 3. Attività di modulazione di IFNs su PD-L1 e PD-L2 in linee wtGIST

A) Modulazione di PD-L1 dopo trattamento con IFN α e IFN γ ; B) Aumento dell'espressione in fold di PD-L1 rispetto ai controlli non trattati; C) Modulazione di PD-L2 dopo trattamento con IFN α e IFN γ ; D) Aumento dell'espressione in fold di PD-L2 rispetto ai controlli non trattati.

(****p<0.0001; *p<0.05; T-test non parametrico)

È stato inoltre valutato l'effetto modulatore degli IFNs su molecole di membrana HLA-I e la β 2-microglobulina, coinvolte nella presentazione antigenica al comparto linfocitario. Si può osservare lo stesso trend positivo già descritto per PD-L1/2, infatti il trattamento *in vitro* con IFN α (N=20) e IFN γ (N=21) ha apportato un incremento significativo dell'intensità di espressione (MFI) delle molecole dell'HLA-I (MFI media : IFN α 217, IFN γ 285 rispetto a 126 del non trattato) (Fig. 4 A), con un aumento in termini di fold di 2,3 e 2,8, rispettivamente calcolato sul corrispettivo controllo non trattato (Fig. 4 B).

Allo stesso modo si osserva una modulazione positiva sulla $\beta 2$ -microglobulina, in particolare l'esposizione ad IFN α (n=18) e IFN γ (n=19) risulta in un aumento significativo dell'intensità di espressione (MFI media: IFN α 383, IFN γ 342, non trattato 201,) (Fig. 4 C), con un aumento di 1,8 e 1,9 fold, rispettivamente (Fig. 4 D).

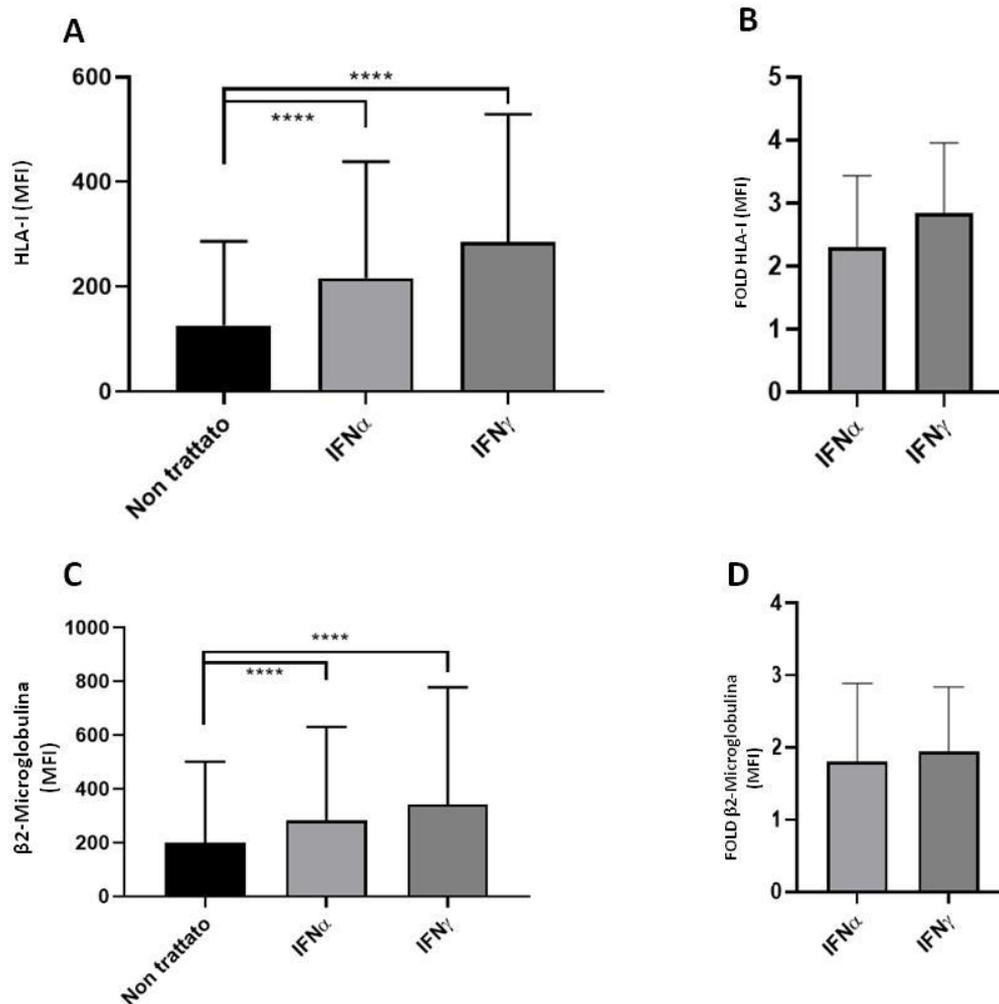


Figura 4. Attività di modulazione di IFNs su HLA-I e $\beta 2$ -microglobulina nelle linee wtGIST

A) Modulazione di HLA-I dopo trattamento con IFN α e IFN γ ; B) Aumento dell'espressione in fold di HLA-I rispetto ai controlli non trattati; C) Modulazione di $\beta 2$ -microglobulina dopo trattamento con IFN α e IFN γ ; D) Aumento dell'espressione di $\beta 2$ -microglobulina (fold) rispetto ai controlli non trattati.

(****p<0.0001; T-test non parametrico)

I dati supportano quindi un'azione immunomodulatoria ad opera degli IFNs su linee wtGIST, che può indipendentemente aggiungersi e verosimilmente sinergizzare con l'effetto citotossico antitumorale diretto, quando presente.

4.4 Espressione dei recettori di IFN α e γ in linee wtGIST

Abbiamo esplorato l'espressione, a livello trascrizionale e di membrana, dei recettori per IFN α ed IFN γ nelle linee wtGIST nel tentativo di un'interpretazione meccanicistica dei dati funzionali soprariportati. Abbiamo quantificato l'espressione di RNA messaggero (mRNA) dei recettori di IFN α e γ (subunità R1) con saggi di qRT-PCR su 9 delle nostre linee wtGIST.

I livelli di RNA messaggero dei recettori di entrambi gli interferoni sono rappresentati in termini di fold change. Come controllo positivo sono stati utilizzati 4 diversi campioni di PBMC, isolati da sangue periferico di paziente e tutti i valori sono stati normalizzati su tre geni housekeeping (PGK, GAPDH e HPRT). Per entrambi i recettori si è riscontrata una buona espressione di mRNA, con mediane di espressione di 0,89 (range 0,64-0,96) per IFN α R1 e 0,91 (range 0,82-0,96) per IFN γ R1 (Fig. 5).

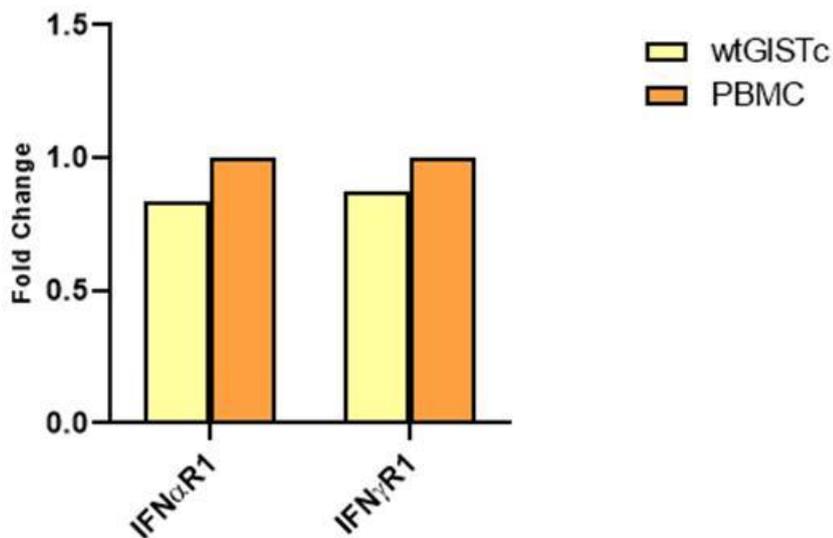


Figura 5. mRNA dei recettori degli IFNs in linee wtGIST e PBMC

9 linee wtGIST sono state analizzate tramite qRT-PCR per verificare la presenza di mRNA degli IFNs R1. I valori sono rappresentati in figura in termini di fold change rispetto a quattro campioni di PBMC utilizzati come controllo, tutti i valori sono normalizzati su tre geni housekeeping.

Parallelamente abbiamo valutato l'espressione in membrana degli stessi recettori su 5 linee wtGIST con analisi citofluorimetriche, utilizzando PBMC come controllo.

L'espressione di membrana valutata citofluorimetricamente ha evidenziato livelli di espressione inferiori dell'IFN α R1 delle linee wtGIST (media \pm SEM 13% \pm 2,4) rispetto all'espressione dei PBMC (33%). Valori comparabili sono stati riscontrati per quanto riguarda l'IFN γ R1 espresso dalle linee wtGIST (media \pm SEM 52% \pm 3,3) paragonato ai livelli di espressione dei PBMC (53%)

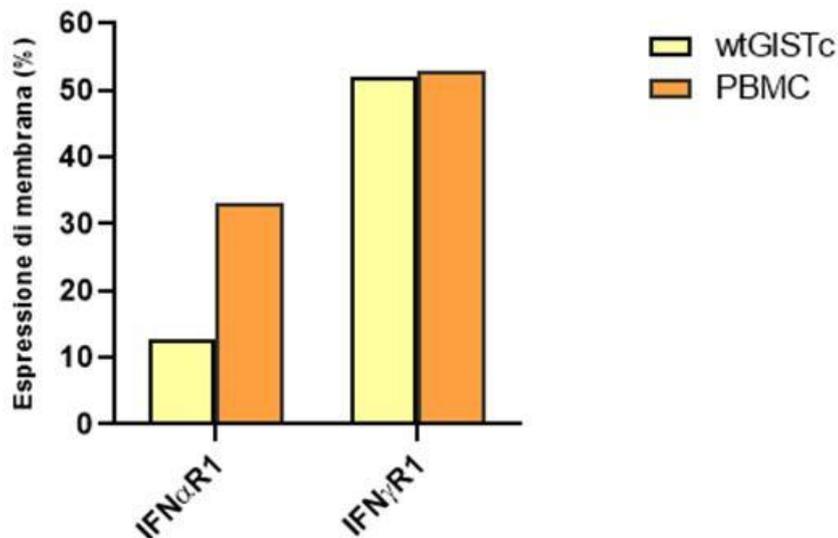


Figura 6. Espressione in membrana dei recettori per gli interferoni in linee wtGIST e PBMC

Espressione dei recettori per gli interferoni in 5 linee wtGIST analizzati tramite citofluorimetria a flusso. L'espressione dell' IFN γ R1 risulta paragonabile ai PBMC di controllo, mentre la presenza dell'IFN α R1 risulta inferiore rispetto al controllo.

In accordo con i dati funzionali, abbiamo riscontrato una minore espressione di IFN α R1 a livello delle linee wtGIST resistenti (n=2) all'azione citotossica diretta dell'IFN α , rispetto alle sensibili (n=3), dove risulta essere maggiormente espresso (media \pm SEM: 6% \pm 0,5 e 12% \pm 2, rispettivamente, Fig. 7 A). Ipotizzando un possibile feedback negativo, alimentato da una produzione autocrina di VEGF in grado di promuovere la degradazione intracellulare dell'IFN α R1(69), in un esperimento selezionato abbiamo valutato tramite saggio immuno-enzimatico (ELISA) la produzione di VEGF su due delle nostre colture cellulari. In figura 7 B è mostrata la differenza significativa di produzione di VEGF tra una linea resistente e una sensibile all'azione antitumorale diretta dell'IFN α , con una produzione media di 245,6 pg/ml e 67 pg/ml, rispettivamente.

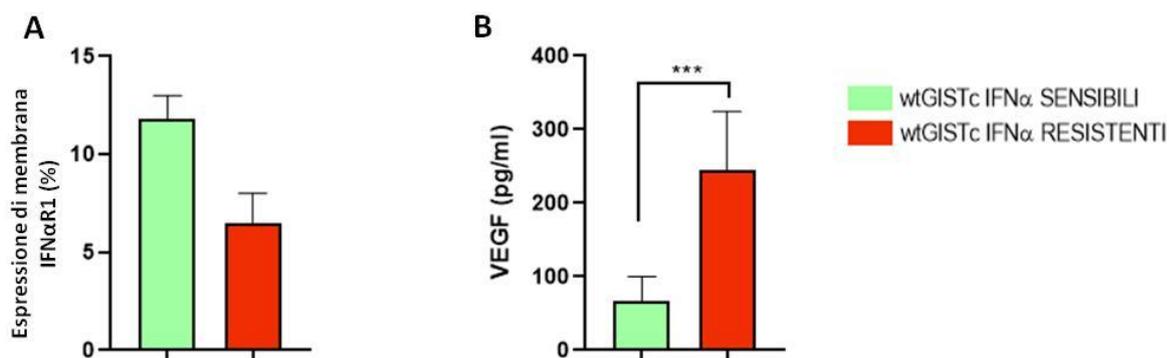


Figura 7. Espressione in membrana del recettore dell'IFN α e produzione di VEGF in linee wtGIST

Differenza di espressione dell'IFN α 1R1 (A) e di produzione di VEGF (B) tra colture cellulari di GIST resistenti e sensibili all'azione citotossica diretta dell'IFN α .

(***p<0.0005, T test non parametrico)

4.5 Combinazione terapeutica tra IFNs e farmaci a bersaglio molecolare

È stato successivamente valutato il possibile effetto di un'azione combinata tra gli IFNs e farmaci a bersaglio molecolare Imatinib e Sunitinib, rispettivamente trattamenti di prima e seconda linea.

Le figure 8 A e B rappresentano i risultati ottenuti dai trattamenti per 72h con Imatinib a dose terapeutica (25nM, n=6) o dose IC50 (n=2), in monoterapia o in combinazione con gli interferoni (IFN α 1x10⁴ IU/ml e IFN γ 1x10³ IU/ml). Tutte le colture testate hanno confermato la loro resistenza ad Imatinib a dosi terapeutiche e non si è verificato alcun sinergismo in termini di attività citotossica se in combinazione con gli interferoni, infatti l'unica azione citotossica notata è quella dell'IFN α nelle colture cellulari sensibili alla sua azione (n=6, Fig. 8 A). Lo stesso andamento è stato osservato con Imatinib ad alte dosi (IC50 media 17 μ M), in cui non si nota alcun sinergismo del trattamento in combinazione se paragonato ai rispettivi trattamenti singoli (n=2, Fig. 8 B).

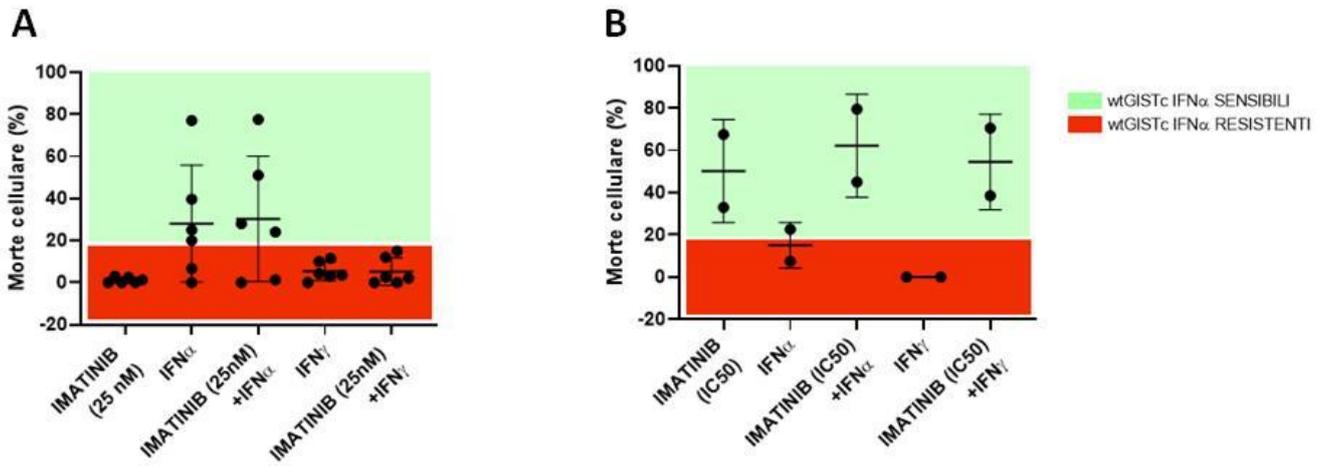


Figura 8. Combinazione terapeutica tra IFNs ed Imatinib in linee wtGIST

Sfondo verde: colture cellulari sensibili ad IFN α ; sfondo rosso: colture cellulari resistenti ad IFN α .

Attività citotossica di Imatinib a dosi terapeutiche (25nM; A; n=6) o ad alte dosi IC50 (B; n=2) e di interferoni (IFN α 1×10^4 IU/ml e IFN γ 1×10^3 IU/ml), in monoterapia e in combinazione. Il trattamento combinato non apporta alcun effetto sinergico antitumorale rispetto alle corrispettive monoterapie, indipendentemente dalla sensibilità o resistenza a questi ultimi.

Lo stesso approccio è stato adottato con Sunitinib, che a differenza dell'Imatinib, ha mostrato una certa attività antitumorale contro le nostre linee. In figura 9 sono rappresentati i risultati ottenuti dal trattamento combinato tra IFNs e Sunitinib (dosi IC50, n=8) e i corrispettivi trattamenti in monoterapia.

I dati ottenuti indicano il Sunitinib come unico responsabile della morte cellulare delle colture testate (Fig. 9). Non sono infatti osservabili differenze in termini di morte cellulare tra il trattamento in monoterapia con Sunitinib e il trattamento in combinazione con IFNs.

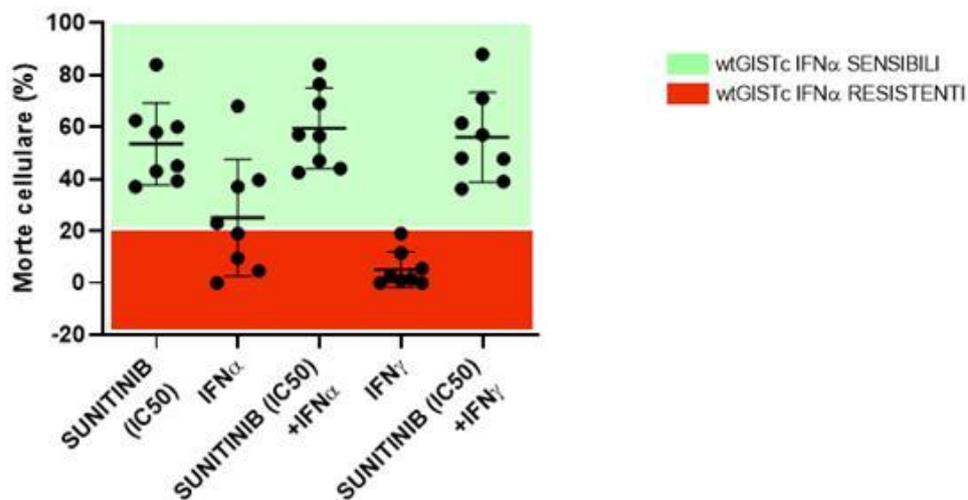


Figura 9. Combinazione terapeutica tra IFNs e Sunitinib in linee wtGIST

Sfondo verde: colture cellulari sensibili ad IFN α ; sfondo rosso: colture cellulari resistenti ad IFN α .

8 linee derivate da GIST wild-type sono state esposte a Sunitinib (dosi IC50), IFN α (1×10^4 IU/ml) o IFN γ (1×10^3 IU/ml), in trattamento singolo o in combinazione per 72h. Il trattamento combinato non apporta alcun effetto sinergico antitumorale rispetto alle corrispettive monoterapie, ed in modo indipendente dalla sensibilità o resistenza a questi ultimi.

4.6 Generazione e caratterizzazione fenotipica di CIK da pazienti con diagnosi di GIST

Come approccio integrato di immunoterapia contro linee wtGIST, abbiamo esplorato una strategia di immunoterapia cellulare basata su linfociti killer CIK, già sviluppata nel nostro laboratorio negli ultimi anni contro varie forme di tumori solidi. Il razionale è quello di valutare un approccio potenzialmente integrato e sinergico per questo peculiare setting tumorale.

Le cellule CIK sono state generate ed espanse *ex vivo* a partire da PBMC (freschi o congelati) di 13 pazienti affetti da GIST, mediante coltura di 3-4 settimane in presenza di IFN γ , Ab-antiCD3 e IL2 come descritto nei metodi.

L'espansione mediana della popolazione CIK è stata di 81 fold (range 13-752), mentre la frazione cellulare co-esprimente le molecole CD3 e CD56 (CD3⁺CD56⁺), ritenuta la principale responsabile dell'attività antitumorale, è risultata presente con un'espressione mediana pari a 43 (range 24-60). Dal punto di vista immunofenotipico le cellule CIK mature si sono dimostrate in gran parte CD8⁺ con un'espressione media del 81% \pm 1,7 (media \pm SEM). L'espressione del recettore NKG2D, considerato responsabile del riconoscimento dei bersagli tumorali da parte delle cellule CIK, si è confermata elevata con un'espressione media dell'83% \pm 3,2 (media \pm SEM), valutata a fine espansione. Inoltre è stata valutata l'espressione di DNAM-1, un altro recettore coinvolto nell'attività citotossica delle CIK, risultato presente in membrana con una media del 94% \pm 1,3 (media \pm SEM).

Al termine della coltura, la presenza di cellule NK con fenotipo CD3⁻CD56⁺ è risultata trascurabile (0,98% \pm 0,15, media \pm SEM). Un'immagine rappresentativa del fenotipo delle CIK al termine della loro espansione è riportata in Figura 10 A.

Sono state inoltre valutate le diverse componenti linfocitarie presenti nell'intera popolazione: effector memory (EM, 59% \pm 5,5), effector memory-RA (EM RA, 13% \pm 2,3), central memory (CM, 8% \pm 1,6) e naïve (20% \pm 4,2) (media \pm SEM, n=12, Fig. 10 B).

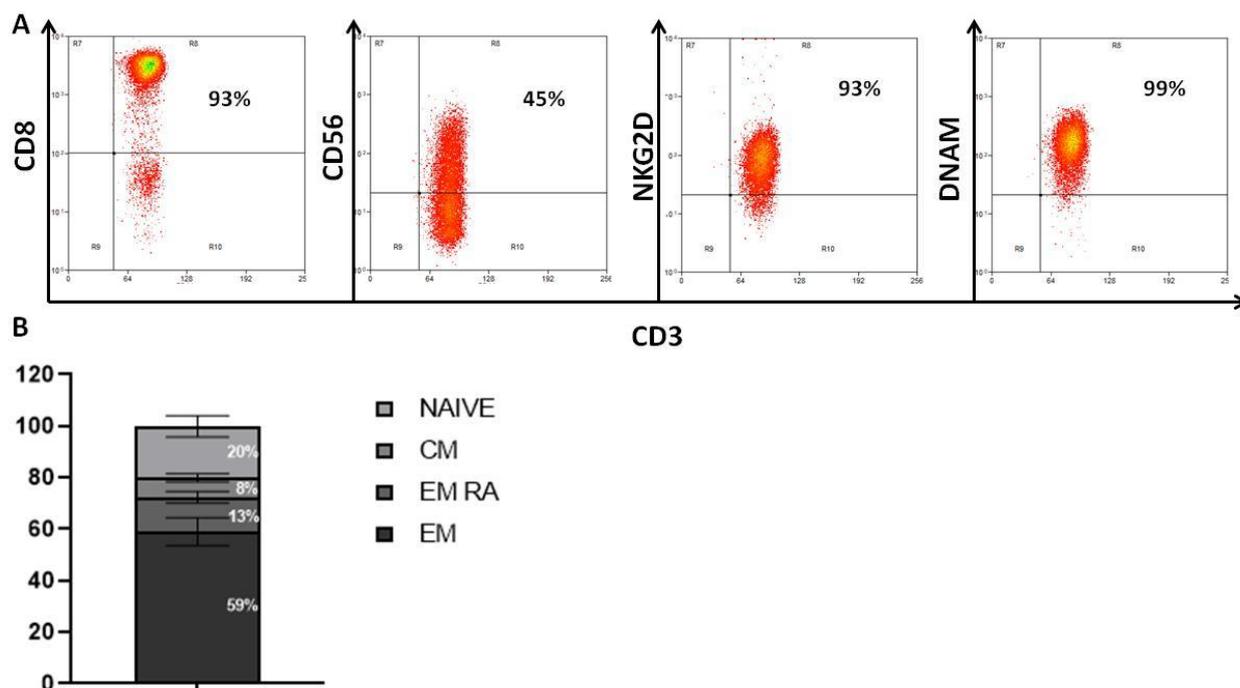


Figura 10. Caratteristiche fenotipiche e componenti linfocitarie di cellule CIK derivate da pazienti GIST

A) Plot di citofluorimetria rappresentativi del fenotipo delle CIK al termine delle 3-4 settimane di coltura. La popolazione matura è per lo più $CD3^+CD8^+$. Le CIK sono $CD3^+$ e coesprimono in membrana la molecola CD56. Un'elevata percentuale di cellule esprime in membrana i recettori NKG2D e DNAM-1, responsabili del riconoscimento tumorale. B) Distribuzione delle diverse componenti linfocitarie nell'intera popolazione di cellule CIK.

Abbiamo anche valutato l'espressione in membrana di alcune molecole immunoregolatricie (Immunocheckpoints) quali PD1 (25 ± 4), TIM3 (51 ± 9), LAG3 ($16\pm 2,1$) e TIGIT (74 ± 4) (media \pm SEM) e di alcune molecole attivatorie delle cellule Natural Killer: NKp30 ($9\pm 1,5$), NKp44 ($4\pm 0,98$) e NKp46 ($6\pm 1,2$) (media \pm SEM) che sono risultate poco espresse (n=12, Tab. 2).

| | PD1 | TIM3 | LAG3 | TIGIT | NKp30 | NKp44 | NKp46 |
|----------|-----|------|------|-------|-------|-------|-------|
| CIK S045 | 6 | 61 | 16 | 77 | 15 | 2 | 4 |
| CIK S061 | 28 | 38 | 15 | 71 | 4 | 1 | 2 |
| CIK S075 | 10 | 27 | 11 | 90 | 11 | 11 | 15 |
| CIK S095 | 36 | 33 | 33 | 91 | 16 | 9 | 3 |
| CIK S100 | 25 | 96 | 26 | 93 | 13 | 3 | 2 |
| CIK S108 | 13 | 60 | 14 | 69 | 13 | 2 | 4 |
| CIK S118 | 12 | 38 | 7 | 90 | 11 | 1 | 2 |
| CIK S121 | 34 | 15 | 10 | 58 | 4 | 4 | 8 |
| CIK S127 | 59 | 18 | 10 | 56 | 3 | 4 | 6 |
| CIK S129 | 32 | 100 | 17 | 66 | 8 | 3 | 9 |
| CIK S181 | 33 | 100 | 14 | 72 | 2 | 1 | 2 |
| CIK S188 | 15 | 31 | 23 | 56 | 5 | 8 | 11 |

Tabella 2. Molecole inibitorie dei checkpoint immunitari e attivatorie delle NK presenti sulle cellule CIK

4.7 Espressione dei ligandi dei recettori citotossici delle CIK in linee wtGIST

Con lo scopo di valutare la possibile interazione tra CIK e cellule tumorali di GIST, è stata analizzata *in vitro* l'espressione in membrana dei principali ligandi dei recettori NKG2D (MICA/B, ULBPs) e DNAM-1 (CD112 e CD155).

I ligandi dei recettori citotossici maggiormente espressi dalle linee wtGIST (n=11) sono risultati ULBP2,5,6 e MICA/B, con valori medi pari a $61\% \pm 3,5$ (media \pm SEM, n=48) e $21\% \pm 4$ (media \pm SEM, n=45) rispettivamente. ULBP1 e 3 risultano invece meno espressi con valori medi di espressione di $3\% \pm 1,1$ (n=42) e $13\% \pm 6,5$ (n=43), come anche i ligandi di DNAM-1, con valori di espressione medi pari a $2\% \pm 1,4$ per CD112 (media \pm SEM, n=38) e $8\% \pm 1,8$ per CD155 (media \pm SEM, n=43) (Fig. 11).

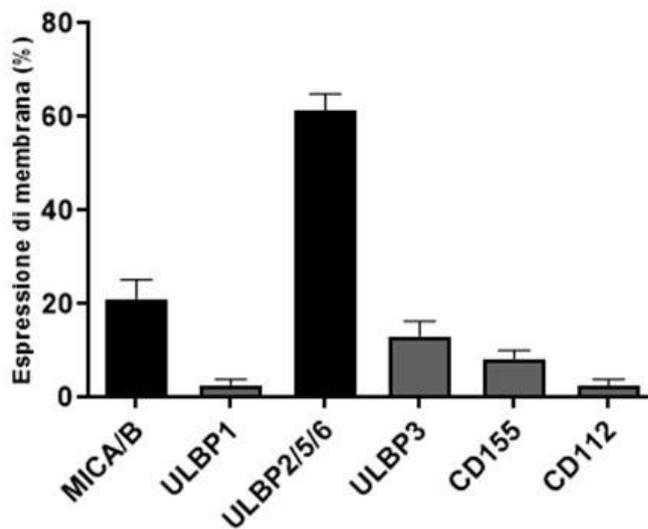


Figura 11. Espressione dei ligandi dei recettori citotossici delle cellule CIK su linee wtGIST

I ligandi del recettore NKG2D delle CIK maggiormente espressi dalle linee wtGIST sono ULBP2/5/6 e MICA/B, mentre gli altri ligandi, compresi quelli del recettore DNAM-1, sono presenti in percentuali inferiori.

4.8 Attività antitumorale delle CIK e delle NK-92 contro linee wtGIST

Abbiamo valutato l'attività antitumorale *in vitro* delle cellule CIK (n=8) contro le nostre linee wtGIST (n=9). Gli esperimenti sono stati condotti sia in un setting di tipo autologo (n=5), in cui CIK e cellule tumorali sono state generate dallo stesso paziente, che in un setting di tipo allogeneico (n=7), dove invece effettori e bersagli originano da diverso paziente. I test di citotossicità sono stati eseguiti al termine dell'espansione *ex vivo* delle CIK e dopo valutazione delle caratteristiche fenotipiche.

Le cellule CIK sono state messe in co-cultura con i bersagli tumorali per 72h, risultando efficaci nell'eliminazione del bersaglio, con una morte tumorale specifica media pari a $67\% \pm 4,7$, $52\% \pm 4,4$, $39\% \pm 4,7$ e $23\% \pm 4,2$ (media \pm SEM, n=15) rispettivamente per i rapporti effettore:bersaglio 10:1, 5:1, 2,5:1 e 1:1 (Fig. 12).

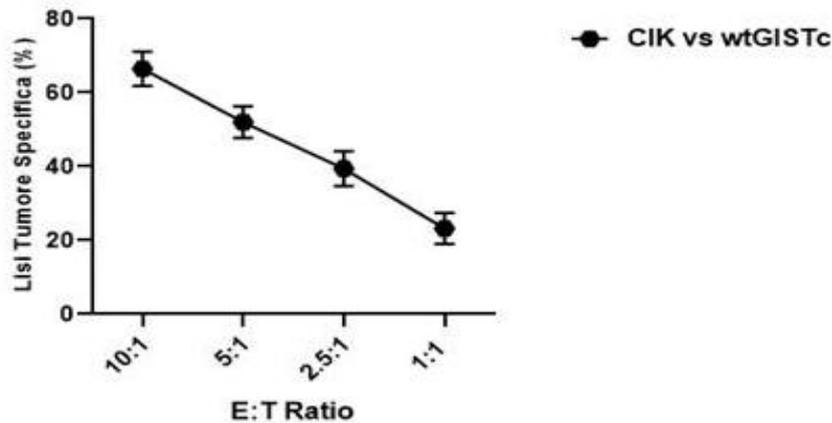


Figura 12. Attività antitumorale di cellule CIK verso linee wtGIST

Le cellule CIK uccidono efficacemente il bersaglio tumorale ai rapporti effettore:bersaglio analizzati.

In esperimenti selezionati è stata indagata l'attività delle CIK in sequenza ai vari trattamenti precedentemente descritti, al fine di esplorare un possibile ruolo in sinergismo contro la frazione tumorale sopravvissuta o resistente.

La lisi tumorale contro linee wtGIST sopravvissute a trattamento con farmaci a bersaglio molecolare Imatinib e Sunitinib risulta sovrapponibile a quella contro GIST non precedentemente trattati, con una morte tumorale specifica media pari a 77%±4, 58%±3,3, 34%±4 e 18%±2 (media±SEM, n=5) per i rapporti effettore:bersaglio 10:1, 5:1, 2,5:1 e 1:1 rispettivamente (Fig. 13).

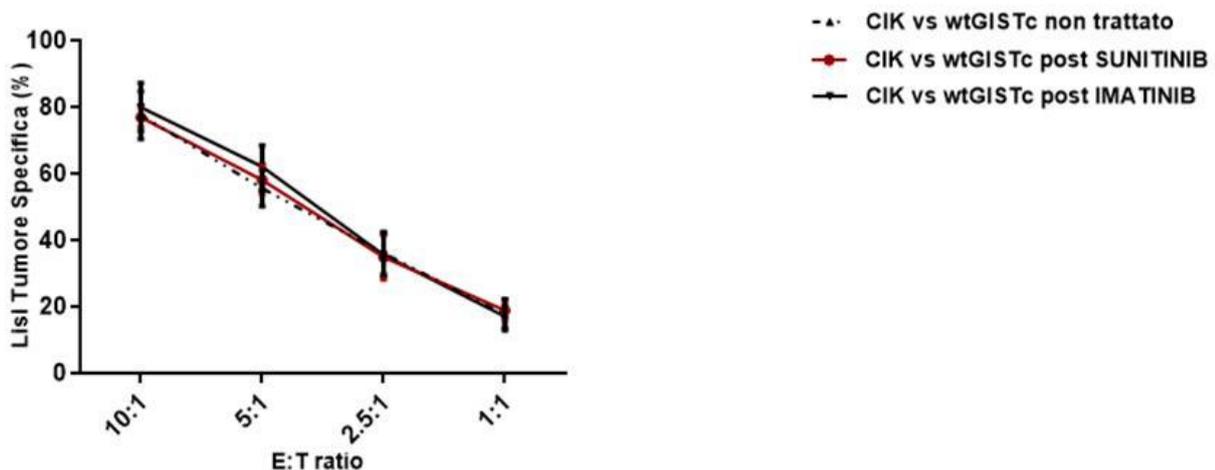


Figura 13. Attività antitumorale di CIK contro linee wtGIST sopravvissute a trattamento con terapia a bersaglio molecolare

Le CIK mostrano un'attività antitumorale efficace contro le linee wtGIST. L'attività citotossica è paragonabile tra le linee wtGIST non trattate e quelle sopravvissute a trattamento con Imatinib e Sunitinib.

In altri esperimenti (n=6) abbiamo testato l'attività delle cellule CIK contro linee wtGIST sopravvissute a trattamento con IFNs. Abbiamo testato sia linee cellulari di GIST sensibili (n=3) sia resistenti (n=1) all'azione diretta dell' IFN α .

La lisi tumorale specifica delle linee wtGIST resistenti a IFN α (59% \pm 10, 45% \pm 4,1 e 20% \pm 2,5, media \pm SEM) e IFN γ (62% \pm 7,7, 44% \pm 7,1 e 20% \pm 3,8, media \pm SEM) risulta sovrapponibile a quella contro wtGIST non precedentemente trattati (63% \pm 6,7, 44% \pm 4,6 e 13% \pm 3,3, media \pm SEM) (rapporti E:T 10:1, 5:1 e 1:1, Fig. 14).

Diversamente, la lisi tumorale specifica delle linee wtGIST sensibili ad IFN α risulta essere tendenzialmente più intensa rispetto al corrispettivo non trattato, con lisi tumorale specifica del 77% \pm 7,5, 62% \pm 7,5 e 24% \pm 6,3 contro i valori di controllo del 63% \pm 6,7, 44% \pm 4,6 e 13% \pm 3,3 per i rapporti rispettivamente del 10:1, 5:1 e 1:1 (media \pm SEM, Fig. 14).

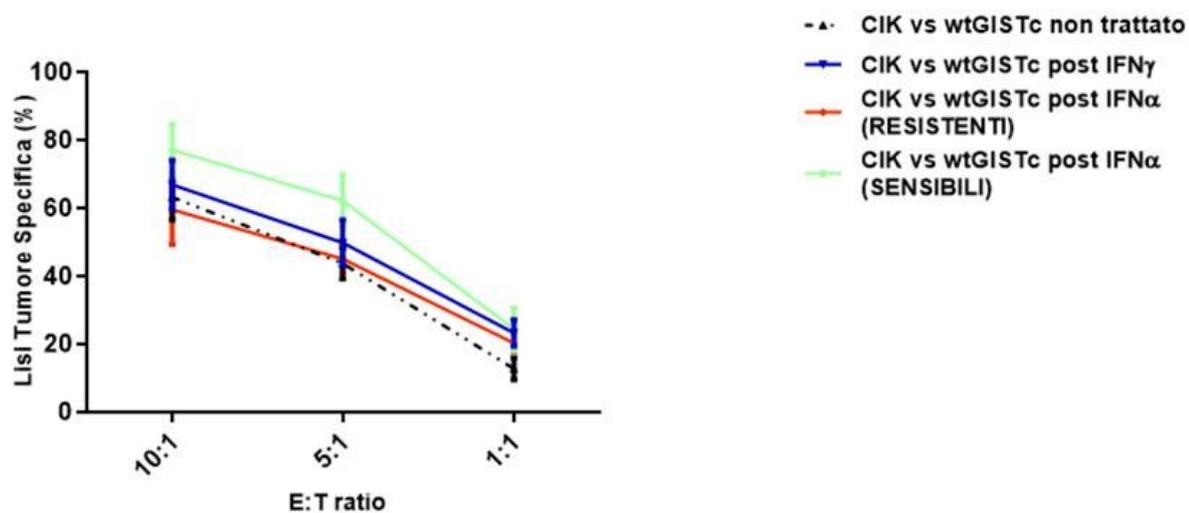


Figura 14. Attività antitumorale diretta di CIK contro linee wtGIST sopravvissute a trattamento con IFNs

Le CIK mostrano un'intensa attività citotossica contro le linee wtGIST. L'attività antitumorale sembra essere paragonabile tra le linee wtGIST non trattate e resistenti ad IFN α e IFN γ , mentre risulta leggermente più intensa nelle linee sensibili all'azione dell'IFN α .

Non è stata evidenziata una maggiore attività citotossica nei test svolti in setting allogeneo rispetto a quelli in autologo, dimostrando che le caratteristiche peculiari e intrinseche di ciascun paziente non influiscono sulla capacità antitumorale delle CIK.

In parallelo al modello principale con linfociti killer CIK, abbiamo esplorato un approccio basato sulla linea NK-92; i due effettori condividono lo stesso meccanismo di riconoscimento e lisi tumorale mediati da NKG2D. La valutazione di questo approccio, oltre a confermare la strategia

immunoterapica con un secondo modello di effettori, può avere una valenza in prospettiva clinica essendo le NK-92 attualmente utilizzate in trials clinici (previo irradiamento) grazie all'ampia disponibilità cellulare indipendente da prelievi ematici da donatori.

Per i nostri saggi di citotossicità la linea NK-92 è stata messa in co-coltura con le linee wtGIST (n=8) per 48h a diversi rapporti effettore:bersaglio (2:1, 1:1, 1:2, 1:4, 1:8, 1:16 e 1:32).

Le NK-92 si sono mostrate particolarmente efficaci contro le linee wtGIST anche nei rapporti effettore:bersaglio più sfavorevoli, con lisi tumorali specifiche medie pari a 68 ± 5 , 61 ± 5 , $53\pm 5,4$, $44\pm 5,3$, $32\pm 4,2$, 22 ± 3 e $18\pm 2,4$ (media \pm SEM, n=31, Fig. 15).

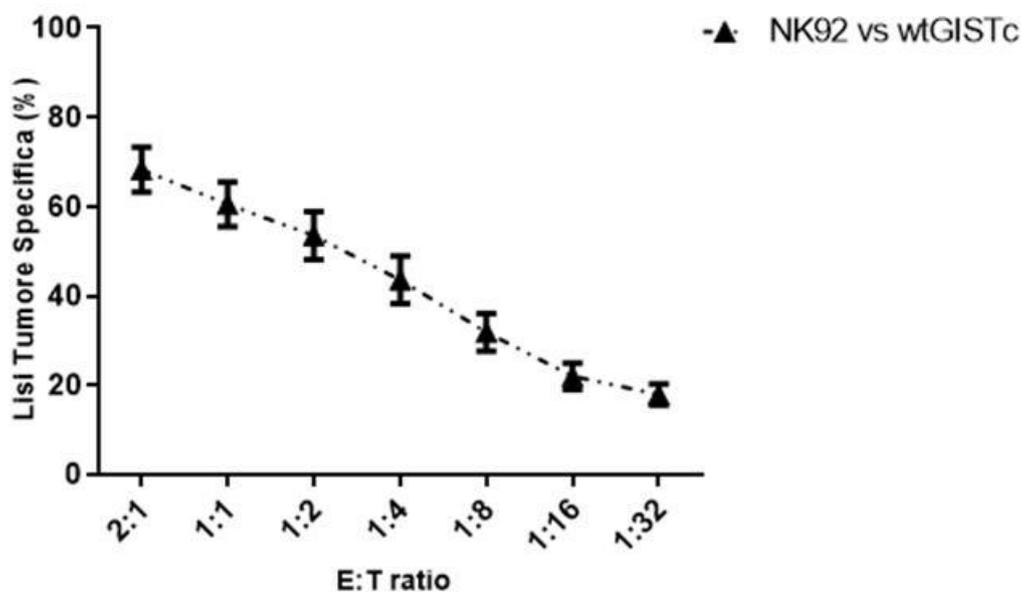


Figura 15. Attività antitumorale diretta di NK-92 contro linee wtGIST

La linea NK-92 ha mostrato un'intensa attività antitumorale diretta contro le linee wtGIST, con lisi tumorale specifica alta anche nei rapporti effettore:bersaglio più sfavorevoli.

5. DISCUSSIONE

In questo lavoro abbiamo realizzato un modello preclinico *in vitro* con linee primarie di GIST negativi per le comuni mutazioni di c-KIT/PDGFR (wtGIST), resistenti ai convenzionali trattamenti medici, utilizzandolo come piattaforma sperimentale per esplorare approcci immunoterapici con interferoni e linfociti killer. La presenza di GIST negativi per le mutazioni c-KIT/PDGFR è stata descritta sporadicamente, prevalentemente a seguito di trattamenti prolungati ma anche come evento possibile *de novo* in assenza di terapie. Clinicamente si associa ad una situazione complessa, caratterizzata da resistenza al trattamento con Imatinib, cardine della terapia medica nei GIST. L'ottenimento del modello con linee tumorali derivate da biopsie chirurgiche, costituisce esso stesso un risultato. L'intento era realizzare una piattaforma, sfruttabile sperimentalmente e rappresentativa di uno scenario clinico peculiare, con un quadro mutazionale atipico per i GIST e clinicamente di resistenza alla terapia standard. L'analisi molecolare condotta sulle biopsie chirurgiche di GIST ci ha permesso di acquisire dati sulla frequenza di questi complessi quadri molecolari. La nostra casistica, pur limitata a 38 pazienti, assume un certo peso nella considerazione della rarità della patologia GIST. La frequenza riscontrata di wtGIST *de novo*, prima di qualunque trattamento medico (5/38), è paragonabile a quanto riportato in letteratura. L'assenza di evidenti mutazioni in c-KIT/PDGFR in 13/25 biopsie dopo prolungato trattamento con Imatinib rappresenta un importante dato descrittivo in quanto meno consolidato, seppur descritto, in letteratura. Tale elevata frequenza va interpretata con i limiti della ridotta casistica e di possibili sovra stime legate ad errori di campionamento ed eterogeneità tumorale. Biologicamente le nostre osservazioni potrebbero essere determinate da un processo di dedifferenziazione della neoplasia GIST inizialmente presente, con conseguente perdita dei distintivi connotati morfologici e molecolari. In questa direzione, la nostra ricerca ha come obiettivi attivi una rivalutazione morfo-patologica delle neoplasie wtGIST riscontrate, al fine di classificare meglio eventuali fenomeni di dedifferenziazione. Altra possibile considerazione è quella di un'eterogeneità iniziale della neoplasia, con l'esistenza di diverse componenti e variabile frequenza delle mutazioni, sulla quale si sviluppa un effetto di selezione promosso dalla prolungata terapia medica. Relativamente alle nostre linee tumorali, abbiamo comunque escluso una prevalente componente fibroblastica emersa *in vitro* durante la coltura. La natura tumorale-

maligna è stata confermata con saggi di tumorigenicità *in vivo* e revisione istopatologica. Come considerazione in prospettiva clinica, la nostra osservazione conferma come dopo prolungati trattamenti con Imatinib le neoplasie residue o recidivanti dei pazienti potrebbero presentare quadri morfologici e molecolari dissimili dal quadro GIST di partenza. Questi dati supporterebbero la raccomandazione, quando tecnicamente percorribile, di una rivalutazione morfologica e molecolare dei quadri neoplastici sottoposti a chirurgia dopo terapia medica, o candidati su base empirica a nuove linee di trattamento con farmaci a bersaglio molecolare a seguito di recidiva.

Come detto, la generazione di un modello wtGIST è stata funzionale all'esplorazione di possibili approcci di tipo immunoterapico in questo contesto. Come prima strategia ci siamo dedicati agli effetti antitumorali ed immunomodulatori di IFN α ed IFN γ . Queste citochine, centrali nel funzionamento della fisiologica risposta immunitaria, sono potenzialmente sfruttabili in prospettiva terapeutica. Possono esercitare un'azione citotossica antitumorale diretta, o modulare l'antigenicità tumorale e la conseguente risposta immunitaria endogena. Sono centrali nella presentazione antigenica, con stimolazione delle molecole HLA, ma anche nei meccanismi regolatori negativi promuovendo la sintesi ed espressione di checkpoints quali PD-L1 e PD-L2. In un contesto terapeutico si può immaginare una somministrazione esogena, come già testato nei GIST per IFN α , ma anche una produzione da cellule endogene del sistema immunitario (come ad es. linfociti infiltranti il tumore) o artificialmente somministrate (es. nel contesto di una immunoterapia cellulare).

Come effetto citotossico diretto, lo abbiamo osservato solo relativamente ad IFN α e limitato al 50% dei bersagli wtGIST analizzati. Questa è comunque un'osservazione potenzialmente rilevante, trattandosi di GIST resistenti ad Imatinib. Nessuna effetto sinergico è stato invece evidenziato da possibili associazioni tra citochine e TKi. Stiamo attualmente cercando di approfondire meccanicisticamente le ragioni della resistenza ad IFN α . Pur non essendo ancora definito, un aspetto interessante a questo proposito deriva dal riscontro di una relazione inversa tra espressione del recettore IFN α R1 ed intensità dell'effetto citotossico. La minore espressione del recettore IFN α R1 sembra più probabilmente una conseguenza a livello proteico, in quanto non si sono riscontrate significative differenze a livello trascrizionale. L'ipotesi che stiamo attualmente testando, sostenuta dai dati preliminari presentati, è che possa esserci un'aumentata degradazione di IFN α R1 indotta da un'elevata secrezione autocrina di VEGF. Le nostre linee wtGIST resistenti ad IFN α mostrano, a differenza della controparte sensibile, un'elevata

produzione di VEGF, riprendendo un meccanismo di immune-escape recentemente descritto per il tumore del colon. Esperimenti dedicati, con inibitori selettivi di VEGF sono attualmente in corso, con l'obiettivo di una maggiore delucidazione del meccanismo e possibile prospettiva di sinergismi terapeutici. Se l'ipotesi di una regolazione negativa ad opera di VEGF fosse infatti confermata, un trattamento con anti-VEGF potrebbe ripristinare o potenziare la sensibilità del GIST ad IFN α .

La minore espressione del recettore IFN α R1 non si accompagna comunque ad un annullamento delle funzioni immunomodulatrici esercitate da IFN α , come dimostrato dalla conservata induzione di PD-L1/2, nonché delle molecole del sistema HLA. Questo potrebbe dipendere dalla minore quantità di recettore funzionante, rispetto a quella richiesta per indurre apoptosi, ma anche da una parziale diversificazione dei pathways intracellulari responsabili dei diversi effetti.

La dimostrata induzione, ad opera di IFNs, dei checkpoints PD-L1/2 e molecole HLA a livello delle cellule di wtGIST riveste rilevanza in chiave di possibili strategie immunoterapiche. La presentazione antigenica tumorale verrebbe favorita, con aumento dell'infiltrato linfocitario ed ulteriore amplificazione loco-regionale della produzione di IFNs. A questi eventi, come atteso meccanismo adattativo, potrebbe seguire un'aumentata espressione tumorale di PD-L1/2, fornendo una base per un possibile beneficio da associazione con checkpoint inhibitors. Coerentemente con queste ipotesi, nel trial di associazione di IFN α con Imatinib gli autori avevano effettivamente riportato un aumento di linfociti circolanti ed infiltranti il tumore, base traslazionale richiesta per il successo di approcci con checkpoint inhibitors.

L'ulteriore elemento esplorato in questo lavoro, in qualche modo connesso al ruolo degli IFNs, comprende la prova concettuale di intensa attività *in vitro* di linfociti killer HLA-indipendenti contro wtGIST resistenti a farmaci a bersaglio molecolare. Come effettori ci siamo focalizzati su cellule CIK, modello ampiamente testato dal nostro laboratorio negli ultimi anni, e la linea NK-92. Entrambi questi effettori condividono il meccanismo di killing tumorale basato sul recettore NKG2D i cui ligandi, molecole stress-inducibili, abbiamo dimostrato essere abbondantemente espressi anche sulle cellule di wtGIST. Questi dati di attività, forniscono un'importante base traslazionale su cui programmare possibili strategie composite in questi pazienti. Il nostro ed altri gruppi hanno recentemente dimostrato come i linfociti CIK producano alte quantità di IFN γ , costituendo una fonte di questa citochina che potrebbe concentrarsi proprio a livello tumorale, apportando un indiretto beneficio in termini di immunomodulazione. Dal punto di vista

dell'applicabilità clinica, le CIK hanno dimostrato un'intensa espansione *ex vivo* con protocolli di complessità e costi relativamente contenuti.

Il nostro modello ha consentito attualmente esperimenti funzionali *in vitro*, nel prossimo futuro potremo estendere gli esperimenti in un ambito più complesso di xenotrapianti in topi immunocompromessi. Questo permetterà la simultanea esplorazione di schemi terapeutici complessi, integranti IFNs, immunoterapia cellulare ed eventualmente anche terapia a bersaglio molecolare.

In conclusione, il nostro lavoro ha realizzato un fruibile e realistico modello sperimentale di GIST wild-type. La riscontrata frequenza di dedifferenziazione, con perdita delle mutazioni a seguito del trattamento, sottolinea e rafforza l'importanza di rivalutazioni molecolari prima dell'avvio di nuove strategie in GIST sottoposti a prolungati trattamenti con Imatinib. La dimostrazione di un ruolo centrale per gli IFNs, così come le potenzialità di immunoterapia cellulare HLA-indipendente forniscono i presupposti per studi clinici controllati che esplorino strategie integrate nei pazienti con GIST recidivati dopo le terapie a bersaglio molecolare convenzionali.

6. BIBLIOGRAFIA

1. I. M. Schaefer, A. Mariño-Enríquez, J. A. Fletcher, What is New in Gastrointestinal Stromal Tumor? *Adv Anat Pathol* **24**, 259-267 (2017).
2. B. Nilsson *et al.*, Gastrointestinal stromal tumors: the incidence, prevalence, clinical course, and prognostication in the preimatinib mesylate era--a population-based study in western Sweden. *Cancer* **103**, 821-829 (2005).
3. S. Hirota *et al.*, Gain-of-function mutations of c-kit in human gastrointestinal stromal tumors. *Science* **279**, 577-580 (1998).
4. L. G. Kindblom, H. E. Remotti, F. Aldenborg, J. M. Meis-Kindblom, Gastrointestinal pacemaker cell tumor (GIPACT): gastrointestinal stromal tumors show phenotypic characteristics of the interstitial cells of Cajal. *Am J Pathol* **152**, 1259-1269 (1998).
5. A. W. Beham, I. M. Schaefer, P. Schüller, S. Cameron, B. M. Ghadimi, Gastrointestinal stromal tumors. *Int J Colorectal Dis* **27**, 689-700 (2012).
6. T. M. Parab *et al.*, Gastrointestinal stromal tumors: a comprehensive review. *J Gastrointest Oncol* **10**, 144-154 (2019).
7. C. E. Wu, C. Y. Tzen, S. Y. Wang, C. N. Yeh, Clinical Diagnosis of Gastrointestinal Stromal Tumor (GIST): From the Molecular Genetic Point of View. *Cancers (Basel)* **11**, (2019).
8. C. L. Corless, Gastrointestinal stromal tumors: what do we know now? *Mod Pathol* **27 Suppl 1**, S1-16 (2014).
9. V. C. Broudy, Stem cell factor and hematopoiesis. *Blood* **90**, 1345-1364 (1997).
10. T. Nishida, S. Hirota, Biological and clinical review of stromal tumors in the gastrointestinal tract. *Histol Histopathol* **15**, 1293-1301 (2000).
11. S. R. Weiler *et al.*, JAK2 is associated with the c-kit proto-oncogene product and is phosphorylated in response to stem cell factor. *Blood* **87**, 3688-3693 (1996).
12. R. Palmirotta *et al.*, Mutational analysis of gastrointestinal stromal tumors (GISTs): procedural approach for diagnostic purposes. *Cancer Genomics Proteomics* **10**, 115-123 (2013).
13. K. A. Janeway *et al.*, Defects in succinate dehydrogenase in gastrointestinal stromal tumors lacking KIT and PDGFRA mutations. *Proc Natl Acad Sci U S A* **108**, 314-318 (2011).
14. J. Lasota, Z. Wang, S. Y. Kim, L. Helman, M. Miettinen, Expression of the receptor for type I insulin-like growth factor (IGF1R) in gastrointestinal stromal tumors: an immunohistochemical study of 1078 cases with diagnostic and therapeutic implications. *Am J Surg Pathol* **37**, 114-119 (2013).
15. K. Akahoshi, M. Oya, T. Koga, Y. Shiratsuchi, Current clinical management of gastrointestinal stromal tumor. *World J Gastroenterol* **24**, 2806-2817 (2018).
16. E. E. S. N. W. Group, Gastrointestinal stromal tumours: ESMO Clinical Practice Guidelines for diagnosis, treatment and follow-up. *Ann Oncol* **25 Suppl 3**, iii21-26 (2014).
17. L. Gatto *et al.*, Radiotherapy in the management of gist: state of the art and new potential scenarios. *Clin Sarcoma Res* **7**, 1 (2017).
18. R. P. Dematteo, M. C. Heinrich, W. M. El-Rifai, G. Demetri, Clinical management of gastrointestinal stromal tumors: before and after STI-571. *Hum Pathol* **33**, 466-477 (2002).
19. B. E. Plaat *et al.*, Soft tissue leiomyosarcomas and malignant gastrointestinal stromal tumors: differences in clinical outcome and expression of multidrug resistance proteins. *J Clin Oncol* **18**, 3211-3220 (2000).
20. P. Reichardt, The Story of Imatinib in GIST - a Journey through the Development of a Targeted Therapy. *Oncol Res Treat* **41**, 472-477 (2018).

21. C. F. Waller, Imatinib Mesylate. *Recent Results Cancer Res* **212**, 1-27 (2018).
22. C. Serrano *et al.*, Novel Insights into the Treatment of Imatinib-Resistant Gastrointestinal Stromal Tumors. *Target Oncol* **12**, 277-288 (2017).
23. C. R. Antonescu *et al.*, Acquired resistance to imatinib in gastrointestinal stromal tumor occurs through secondary gene mutation. *Clin Cancer Res* **11**, 4182-4190 (2005).
24. M. C. Heinrich *et al.*, Kinase mutations and imatinib response in patients with metastatic gastrointestinal stromal tumor. *J Clin Oncol* **21**, 4342-4349 (2003).
25. C. R. Antonescu, The GIST paradigm: lessons for other kinase-driven cancers. *J Pathol* **223**, 251-261 (2011).
26. C. Karakas, P. Christensen, D. Baek, M. Jung, J. Y. Ro, Dedifferentiated gastrointestinal stromal tumor: Recent advances. *Ann Diagn Pathol* **39**, 118-124 (2019).
27. C. R. Antonescu *et al.*, Dedifferentiation in gastrointestinal stromal tumor to an anaplastic KIT-negative phenotype: a diagnostic pitfall: morphologic and molecular characterization of 8 cases occurring either de novo or after imatinib therapy. *Am J Surg Pathol* **37**, 385-392 (2013).
28. M. Díaz Delgado *et al.*, Gastrointestinal stromal tumors: morphological, immunohistochemical and molecular changes associated with kinase inhibitor therapy. *Pathol Oncol Res* **17**, 455-461 (2011).
29. P. Pauwels *et al.*, Changing phenotype of gastrointestinal stromal tumours under imatinib mesylate treatment: a potential diagnostic pitfall. *Histopathology* **47**, 41-47 (2005).
30. M. C. Heinrich *et al.*, Primary and secondary kinase genotypes correlate with the biological and clinical activity of sunitinib in imatinib-resistant gastrointestinal stromal tumor. *J Clin Oncol* **26**, 5352-5359 (2008).
31. E. Wardelmann *et al.*, Polyclonal evolution of multiple secondary KIT mutations in gastrointestinal stromal tumors under treatment with imatinib mesylate. *Clin Cancer Res* **12**, 1743-1749 (2006).
32. B. Liegl *et al.*, Heterogeneity of kinase inhibitor resistance mechanisms in GIST. *J Pathol* **216**, 64-74 (2008).
33. G. D. Demetri *et al.*, Molecular target modulation, imaging, and clinical evaluation of gastrointestinal stromal tumor patients treated with sunitinib malate after imatinib failure. *Clin Cancer Res* **15**, 5902-5909 (2009).
34. S. George *et al.*, Efficacy and safety of regorafenib in patients with metastatic and/or unresectable GI stromal tumor after failure of imatinib and sunitinib: a multicenter phase II trial. *J Clin Oncol* **30**, 2401-2407 (2012).
35. J. Martin-Broto, D. S. Moura, New drugs in gastrointestinal stromal tumors. *Curr Opin Oncol* **32**, 314-320 (2020).
36. M. Mohammadi, H. Gelderblom, Systemic therapy of advanced/metastatic gastrointestinal stromal tumors: an update on progress beyond imatinib, sunitinib, and regorafenib. *Expert Opin Investig Drugs*, 1-10 (2020).
37. G. Z. Li, C. P. Raut, Targeted therapy and personalized medicine in gastrointestinal stromal tumors: drug resistance, mechanisms, and treatment strategies. *Onco Targets Ther* **12**, 5123-5133 (2019).
38. A. Le Cesne *et al.*, Phase II study of oral masitinib mesilate in imatinib-naïve patients with locally advanced or metastatic gastro-intestinal stromal tumour (GIST). *Eur J Cancer* **46**, 1344-1351 (2010).
39. G. D. Demetri *et al.*, Efficacy and safety of regorafenib for advanced gastrointestinal stromal tumours after failure of imatinib and sunitinib (GRID): an international, multicentre, randomised, placebo-controlled, phase 3 trial. *Lancet* **381**, 295-302 (2013).
40. J. Chantharasamee *et al.*, Translating Knowledge About the Immune Microenvironment of Gastrointestinal Stromal Tumors into Effective Clinical Strategies. *Curr Treat Options Oncol* **22**, 9 (2021).

41. Y. Tan, M. T. Garcia-Buitrago, J. C. Trent, A. E. Rosenberg, The immune system and gastrointestinal stromal tumor: a wealth of opportunities. *Curr Opin Oncol* **27**, (2015).
42. Y. Tan, J. C. Trent, B. A. Wilky, D. A. Kerr, A. E. Rosenberg, Current status of immunotherapy for gastrointestinal stromal tumor. *Cancer Gene Ther*, (2017).
43. V. Kasireddy, M. von Mehren, Emerging drugs for the treatment of gastrointestinal stromal tumour. *Expert Opin Emerg Drugs* **22**, 317-329 (2017).
44. M. Burgess, H. Tawbi, Immunotherapeutic approaches to sarcoma. *Curr Treat Options Oncol* **16**, 26 (2015).
45. L. L. Chen *et al.*, Exploiting antitumor immunity to overcome relapse and improve remission duration. *Cancer Immunol Immunother* **61**, (2012).
46. L. Y. Zhang, J. S. Huang, Z. M. Pi, M. Y. Yu, Inhibition effect of Peg-IFN α -2b and Imatinib alone or combination on imatinib-resistant gastrointestinal stromal tumors cell lines. *Int J Clin Exp Pathol* **8**, 11340-11347 (2015).
47. L. L. Chen, L. Gouw, M. Sabripour, W. J. Hwu, R. S. Benjamin, Combining targeted therapy with immunotherapy (interferon- α): Rational, efficacy in gastrointestinal stromal tumor model and implications in other malignancies. *Oncoimmunology* **1**, 773-776 (2012).
48. P. Grivas *et al.*, Immune Checkpoint Inhibitors as Switch or Continuation Maintenance Therapy in Solid Tumors: Rationale and Current State. *Target Oncol* **14**, 505-525 (2019).
49. K. Madden, M. K. Kasler, Immune Checkpoint Inhibitors in Lung Cancer and Melanoma. *Semin Oncol Nurs* **35**, 150932 (2019).
50. P. Darvin, S. M. Toor, V. Sasidharan Nair, E. Elkord, Immune checkpoint inhibitors: recent progress and potential biomarkers. *Exp Mol Med* **50**, 1-11 (2018).
51. S. Kruger *et al.*, Advances in cancer immunotherapy 2019 - latest trends. *J Exp Clin Cancer Res* **38**, 268 (2019).
52. R. Zhao *et al.*, PD-1/PD-L1 blockade rescue exhausted CD8⁺ T cells in gastrointestinal stromal tumours via the PI3K/Akt/mTOR signalling pathway. *Cell Prolif* **52**, e12571 (2019).
53. S. P. D'Angelo *et al.*, Combined KIT and CTLA-4 Blockade in Patients with Refractory GIST and Other Advanced Sarcomas: A Phase Ib Study of Dasatinib plus Ipilimumab. *Clin Cancer Res* **23**, 2972-2980 (2017).
54. H. Komita *et al.*, Expression of immune checkpoint molecules of T cell immunoglobulin and mucin protein 3/galectin-9 for NK cell suppression in human gastrointestinal stromal tumors. *Oncol Rep* **34**, (2015).
55. S. A. Rosenberg *et al.*, Durable complete responses in heavily pretreated patients with metastatic melanoma using T-cell transfer immunotherapy. *Clin Cancer Res* **17**, 4550-4557 (2011).
56. P. F. Robbins *et al.*, Tumor regression in patients with metastatic synovial cell sarcoma and melanoma using genetically engineered lymphocytes reactive with NY-ESO-1. *J Clin Oncol* **29**, 917-924 (2011).
57. R. Rotolo *et al.*, CAR-Based Strategies beyond T Lymphocytes: Integrative Opportunities for Cancer Adoptive Immunotherapy. *Int J Mol Sci* **20**, (2019).
58. S. C. Katz *et al.*, Anti-KIT designer T cells for the treatment of gastrointestinal stromal tumor. *J Transl Med* **11**, (2013).
59. G. Mesiano *et al.*, Cytokine Induced Killer cells are effective against sarcoma cancer stem cells spared by chemotherapy and target therapy. *Oncoimmunology* **7**, e1465161 (2018).
60. G. Mesiano *et al.*, Cytokine-induced killer (CIK) cells as feasible and effective adoptive immunotherapy for the treatment of solid tumors. *Expert Opin Biol Ther* **12**, 673-684 (2012).
61. E. Cappuzzello, R. Sommaggio, P. Zanovello, A. Rosato, Cytokines for the induction of antitumor effectors: The paradigm of Cytokine-Induced Killer (CIK) cells. *Cytokine Growth Factor Rev* **36**, 99-105 (2017).

62. G. Mesiano *et al.*, Adoptive immunotherapy against sarcomas. *Expert Opin Biol Ther* **15**, 517-528 (2015).
63. G. Mesiano *et al.*, Analytic and Dynamic Secretory Profile of Patient-Derived Cytokine-Induced Killer Cells. *Mol Med* **23**, (2017).
64. G. Pittari, P. Filippini, G. Gentilcore, J. C. Grivel, S. Rutella, Revving up Natural Killer Cells and Cytokine-Induced Killer Cells Against Hematological Malignancies. *Front Immunol* **6**, 230 (2015).
65. V. Leuci *et al.*, CD44v6 as innovative sarcoma target for CAR-redirectioned CIK cells. *Oncoimmunology* **7**, e1423167 (2018).
66. M. Cheng, Y. Chen, W. Xiao, R. Sun, Z. Tian, NK cell-based immunotherapy for malignant diseases. *Cell Mol Immunol* **10**, 230-252 (2013).
67. F. S. Lichtenegger, F. M. Schnorfeil, W. Hiddemann, M. Subklewe, Current strategies in immunotherapy for acute myeloid leukemia. *Immunotherapy* **5**, 63-78 (2013).
68. G. Suck *et al.*, NK-92: an 'off-the-shelf therapeutic' for adoptive natural killer cell-based cancer immunotherapy. *Cancer Immunol Immunother* **65**, 485-492 (2016).
69. H. Zheng *et al.*, Vascular endothelial growth factor-induced elimination of the type 1 interferon receptor is required for efficient angiogenesis. *Blood* **118**, 4003-4006 (2011).

7. RINGRAZIAMENTI

Ringrazio innanzitutto il Prof. Massimo Aglietta per avermi permesso di proseguire il mio percorso nella ricerca oncologica dopo il conseguimento della laurea, presso il laboratorio di Oncologia Medica dell'IRCC di Candiolo.

Ringrazio Dario, per avermi sempre spronato a fare meglio, per tutti i consigli dispensati e per aver contribuito così tanto alla mia crescita scientifica ma anche personale.

Grazie a Giulia, mia unica e insostituibile collega e amica, per tutte le gioie condivise, le risate, le canzoni cantate sotto cappa e tutto quello che abbiamo vissuto insieme in lab (e anche fuori!). Senza di te non sarebbe stato lo stesso.

Ringrazio tutte le altre persone del lab, ognuno di voi mi ha insegnato qualcosa ed è anche grazie a voi che questi anni sono volati! Vi porto tutti con me nel mio bagaglio di esperienza.

Ringrazio i miei genitori, anche se in questi anni è successo di tutto e di più, noi siamo quello che c'è di più vero del termine "famiglia", nonostante tutto sempre uniti e sempre ad incoraggiarci. Vi amo tantissimo.

Ringrazio mio fratello, perchè ha sempre avuto una parola di conforto e mi ha sempre spronato a fare meglio e a vedere le cose da prospettive che di solito mi sfuggono. Ti voglio un bene dell'anima.

Ringrazio il mio amore grande, senza di te probabilmente non avrei intrapreso questo percorso, grazie per i tuoi incoraggiamenti, consigli, abbracci consolatori e grazie per la tua infinita pazienza. Ti amo.

Ringrazio tutti i miei amici, quelli veri. Grazie Claudio, Diletta, Chicco, Marghe, Pier e Ila (e il piccolo Gabriele), Pugg, Toni e Maria (e la piccola Isabella). Tutti, ma proprio tutti, siete un pezzetto del mio cuore.

Ringrazio tutto il gruppo di amici di Torino, che con serate spensierate hanno fatto in modo che la lontananza da casa non pesasse così tanto.