



UNIVERSITA' DEGLI STUDI DI TORINO

SCUOLA DI DOTTORATO IN SCIENZE DELLA VITA E DELLA SALUTE

DOTTORATO IN MEDICINA MOLECOLARE

CICLO XXIX

TITOLO DELLA TESI

**RADIOTERAPIA COME STIMOLO IMMUNOLOGICO NEI PAZIENTI CON MELANOMA O CARCINOMA RENALE
IN TRATTAMENTO CON ALTE DOSI DI INTERLEUCHINA 2: VALUTAZIONE DI BIOMARCATORI
IMMUNOLOGICI E RISPOSTA TERAPEUTICA**

TESI PRESENTATA DA:

ELENA PANCISI

COORDINATORE DEL DOTTORATO:

PROF. FRANCESCO NOVELLI

TUTOR:

PROF.SSA PAOLA CAPPELLO

CO-TUTOR:

PROF.SSA MIRELLA GIOVARELLI

“Coloro che abbiamo amato e che abbiamo perduto, non sono in un luogo ben preciso ma ovunque noi siamo”.

Sant’Agostino

Dedicato ai dei miei genitori

Sommario

Sommario	2
1 INTRODUZIONE	3
1.1 Carcinogenesi	3
2. RUOLO DEL SISTEMA IMMUNITARIO NEL CANCRO	7
2.1 Immunosorveglianza (Eliminazione)	7
2.2 Immunita' innata e addattiva	8
2.3 Evasione	10
2.4 Il sistema HLA	11
2.5 Linfociti T Regolatori	11
2.6 Citochine tumorali	12
2.7 Apoptosi	13
3. EVASIONE TUMORALE	13
4. RADIOTERAPIA E ABSCOPAL EFFECT	14
5. INTERLEUCHINA-2	15
6. RAZIONALE E DISEGNO DI STUDIO	16
6.1 Disegno Statistico	18
6.2 Criteri di inclusione ed esclusione	18
7. MATERIALI E METODI	19
7.1 Caratteristiche dei pazienti e raccolta campioni	19
7.2 ELISPOT Assay	20
7.3 Valutazione immunoistochimica dell'espressione di antigeni tumorali in biopsie pre- e post- trattamento	21
7.4 Effetti indotti dal trattamento sperimentale sulle sottopopolazioni T circolanti	22
7.5 Effetto del trattamento sperimentale sui livelli sierici di VEGF, fibronectina, e citochine proinfiammatorie	22
8. DISCUSSIONE E RISULTATI	23
9. CONCLUSIONI	34
10. BIBLIOGRAFIA	35
11. ELENCO ATTIVITA' FORMATIVE	39

1 INTRODUZIONE

1.1 Carcinogenesi

Il cancro è una malattia genetica somatica complessa e multifattoriale causata da mutazioni a carico di geni oncogeni, oncosoppressori, regolatori dei processi di apoptosi, regolatori dei meccanismi di riparazione del DNA, che vengono espressi in modo inappropriato; viene definita trasformazione tumorale o carcinogenesi il complesso processo che trasforma le cellule sane in cellule cancerose. Le cellule neoplastiche hanno alla base due caratteristiche: la proliferazione cellulare anomala e la propensione alla diffusione e invasione ad organi e tessuti (processo di metastatizzazione). I tumori sono clonali e tutte le cellule contengono mutazioni che vanno ad aumentare nel corso delle replicazioni; è normale trovare profili di espressione genetica diversi nelle nel tumore primitivo e nelle metastasi, per ragioni meramente evolvuzionistiche. L'ambiente e l'esposizione ad agenti chimici, fisici o biologici (virus, infezioni croniche), possono favorire l'insorgenza di tumori; tra i più importanti fattori ambientali vanno annoverati il fumo di tabacco, la dieta e l'esposizioni alle radiazioni naturali.

Circa l'1% dei tumori è associato a mutazioni a carico della linea germinale e ciò determina una maggiore suscettibilità ad alcuni tipi di malattia in chi ne è portatore, seppur vero è che la sola predisposizione genetica non è sufficiente a causare il cancro; sono infatti necessarie ulteriori mutazioni somatiche nella medesima copia del gene mutato nonché su altri geni tumore-associati; per questi motivi lo sviluppo della malattia è molto lento. Una teoria alternativa proposta da Peter Duesberg (finora mai dimostrata) vede come inizio della carcinogenesi un evento di aneuploidia, ovvero l'errato assetto cromosomico (che non implica di per sé la presenza di mutazioni), che destabilizzando il genoma, favorito dal condizionamento ambientale, darebbe via ad una linea cellulare trasformata. L'ambiente è difatti capace non solo di promuovere mutazioni ma di condizionare l'espressione del fenotipo senza alterazione del genotipo; questo fenomeno è chiamato epigenetica. L'epigenetica, definita in origine da C.H.Waddington, è l'interazione casuale tra genotipo e la sua espressione.

I proto-oncogeni sono geni altamente conservati e le proteine codificate regolano in condizioni fisiologiche, i checkpoint del ciclo cellulare, l'apoptosi così come l'embriogenesi, la rimarginazione e rigenerazione di lesioni e tessuti. Questi geni codificano per fattori di crescita, recettori dei fattori di crescita con attività tirosina chinasi, proteine regolatrici nella trasduzione del segnale, non recettori tirosin chinasi, serina/treonina chinasi. Mutazioni a carico di questi geni possono promuovere la loro continua espressione, alcune esempi sono le mutazioni puntiformi, i grossolani riarrangiamenti del DNA, come la traslocazione e l'amplificazione del gene, l'integrazione del genoma di retrovirus (definiti anche virus oncogeni) nel genoma umano e successiva ricombinazione.

Tra questi proto oncogeni va ricordata la famiglia di RAS, in particolare H-RAS, K-RAS e N-RAS e la loro mutazione sui codoni 12, 13 o 61 che li converte a "oncogeni attivi" associati allo sviluppo di numerosi tumori umani.

I geni oncosoppressori sono geni che normalmente inibiscono la proliferazione cellulare ed hanno un'attività opposta rispetto ai geni proto-oncogeni. In numerosi tumori questi geni vengono persi o risultano inattivati; tra questi i più conosciuti sono p53, RB, APC e BRACA.

Il fattore di trascrizione p53 (codificato dal gene umano TP53 presente sul cromosoma 17), è un principale soppressore tumorale nonché regolatore di varie vie di segnale. p53 esercita molteplici funzioni tra cui la soppressione della crescita tumorale, la capacità arrestare il ciclo cellulare, la riparazione del DNA, regola la senescenza e apoptosi. Mutazioni a carico del gene TP53 sono presenti in quasi tutti i tipi di tumore e questo dimostra l'importanza di p53 come cardine della carcinogenesi. A differenza della maggior parte dei geni oncosoppressori, che di solito vengono inattivati durante la progressione del cancro da delezioni o mutazioni troncanti, il gene TP53 nei tumori umani viene spesso sottoposto a mutazioni missenso su un singolo nucleotide con la conseguente produzione di una proteina intera contenente solo una singola sostituzione di amminoacidi. Le mutazioni TP53 associate al cancro sono diverse nelle posizioni all'interno della sequenza codificante p53. Tuttavia, la stragrande maggioranza delle mutazioni determina la perdita

della capacità di p53 di legare il DNA in modo specifico e l'attivazione della trascrizione dei geni di p53. Non è chiaro comunque se p53 abbia già ruolo nell'inizializzazione della trasformazione oppure in fase più avanzata, influenzando anche l'aggressività della malattia, quello che però traspare è che l'inattivazione di WTp53 è molto diversa da tumore a tumore; questa diversità rappresenta un numero infinito di modi in cui una mutazione di p53 potrebbe essere selezionata durante la progressione del cancro, influenzata da molti altri fattori.

E' importante ricordare che entrambe le copie presenti su entrambi i cromosomi di geni proto-oncogeni e geni oncosoppressori, devono essere mutate per promuovere la trasformazione cellulare.

L'apoptosi o morte cellulare programmata, è un processo che coinvolge le caspasi (cistein-proteasi) che consuma ATP. Normalmente le caspasi sono soppresse dalla proteina IAP (*Inhibitor of Apoptosis Protein*); a seguito di stimoli apoptotici, come per esempio danno al DNA, folder anomalo delle proteine, infezioni, ecc., la proteina IAP viene silenziata da SMAC/DIABLO (*Second mitochondria-derived activator of caspase/direct inhibitor of apoptosis-binding protein with low pI*), proteina mitocondriale rilasciata nel citosol. SMAC/DIABLO lega IAP, promuovendo la cascata apoptotica. Altre vie di attivazione sono quelle del *Tumor Necrosis Factor* TNF e di Fas-L. Il TNF è una citochina prodotta dai macrofagi costituita da 157 amminoacidi ed è il principale mediatore dell'apoptosi. A livello di membrana, ha due recettori: TNF-R1 e TNF-R2 e il legame con TNF-R1 attiva le caspasi. La via di FasL è praticamente sovrapponibile a quella innescata da TRAIL (*TNF-Related Apoptosis-Inducing Ligand*); pare che *in vitro* le linee cellulari siano più sensibili a TRAIL rispetto a FasL. Il recettore di Fas (Apo-1/CD95), è membro della superfamiglia dei recettori TNF. Fas è una proteina transmembrana della famiglia dei TNF e presenta in DD (*Death Domain*) privo di attività catalitica; e interagisce con FADD (*FAS Associated protein with Death Domain*), TRADD (*Tumor necrosis factor Receptor type 1-Associated DEATH Domain protein*) e RIP, una proteina chinasi in grado di innescare il processo necroptotico. FADD e TRADD presentano, nella regione N-terminale, un dominio, detto *Death Effector Domain* (DED), che, avendo legato le procaspasi 8 o 10 (con formazione del cosiddetto

DISC (*Death Inducing Signalling Complex*), le attiva per taglio proteolitico. Le caspasi 8 e 10 sono caspasi "iniziatrici", e clivano attivando altre caspasi iniziatrici ed esecutrici. Un altro bersaglio citoplasmatico delle caspasi 8 è Bid fattore pro-apoptotico della famiglia Bcl-2 (*B-cell Lymphoma 2*), che lega Bax, (Bcl-2 family) che permeando la membrana mitocondriale attiva la via intrinseca. La stessa cellula morente può attivare per via autocrina di FAS e TRAIL.

Bcl-2 regola la permeabilità della membrana mitocondriale esterna e comprende sia membri pro sia antiapoptotici. Questa famiglia è composta da proteine transmembrana e solubili (Bid, Bad, Bim, Noxa) tutte ad azione proapoptotica. Quando i segnali di sopravvivenza prevalgono su quelli di morte le proteine di transmembrana proapoptotiche (Bax, Bak) vengono legate e inibite dai membri antiapoptotici (Bcl-2, Bcl-XL, Bcl-w), qualora invece prevalgano i segnali di morte Bax e Bak si formano degli oligomeri che permettono, direttamente o indirettamente, la fuoriuscita di fattori in grado di innescare l'apoptosi qualora si trovino nel citosol. Tra questi fattori, di rilevanza assoluta sono il citocromo c, SMAC/DIABLO, AIF (il Fattore che Induce l'Apoptosi) e l'endonucleasi G. Il citocromo c, nel citosol lega APAF-1 (*apoptotic peptidase activating factor 1*) e la procaspasi 9 (caspasi iniziatrice) in un complesso multiproteico chiamato apoptosoma.

I meccanismi di riparazione del DNA sono degli elaborati sistemi capaci di contrastare i danni causati da agenti esogeni ed endogeni. Ad esempio per i danni a carico del singolo filamento, la metil guanina metil transferasi (MGMT) rimuove i gruppi metilici della guanina. Nell'escissione di base, causata da ossidazione, alchilazione, idrolisi o deamminazione, un nucleotide danneggiato viene sostituito con un nucleotide non danneggiato presente nel DNA, la DNA glicosidasi individua la base alterata; un'endonucleasi e rimuove la base azotata ed infine la DNA polimerasi ripara per escissione di nucleotidi (NER, *Nucleotide Excision Repair*).

2. RUOLO DEL SISTEMA IMMUNITARIO NEL CANCRO

Diversi studi condotti nella prima metà del secolo scorso hanno dimostrato l'immunogenicità dei tumori. La risposta antitumorale è mediata dai linfociti T CD8⁺ (CTL) citotossici e dalle cellule T CD4⁺ helper che potenziano la risposta immunitaria secernendo citochine attivatorie e stimolando la risposta umorale. Le cellule Natural Killer (NK) sono importanti effettrici del sistema immunitario, non esprimono TCR ed uccidono le cellule bersaglio in maniera non ristretta per MHC. Durante l'ultimo secolo si è assistito ad un fervente dibattito sulla capacità del sistema immunitario di regolare lo sviluppo dei tumori. Negli ultimi 70 anni in particolare si è focalizzata la teoria dell'immunosorveglianza inizialmente proposta da Burnet e Thomas. Questa teoria ha di recente avuto nuovo sviluppo ed enfasi anche se è contemporaneamente emerso il fatto che l'eliminazione del tumore rappresenta solo un aspetto del rapporto molto più complesso che esiste fra sistema immunitario e cellule tumorali. La definizione successiva di "*Cancer immunoediting*" vuole proprio descrivere la doppia funzione di protezione e promozione dello sviluppo dei tumori che il sistema immunitario si scopre ad avere. Questo processo dinamico si sviluppa in 3 momenti: eliminazione, equilibrio, evasione (*escape*).

2.1 Immunosorveglianza (Eliminazione)

Vari lavori della prima metà del secolo scorso hanno dimostrato la potenziale immunogenicità delle cellule tumorali, descrivendone i vari antigeni associati. Burnet e Thomas hanno predetto che i linfociti sono i responsabili dell'eliminazione delle cellule mutate e trasformate che nascono continuamente e fisiologicamente durante la vita di un individuo. Il "rigetto" immunologicamente mediato delle cellule tumorali coinvolge, come per la difesa contro i patogeni, sia la risposta innata che adattativa del sistema immunitario. E' probabile che la fase iniziale della risposta anti-tumorale avvenga quando le cellule del sistema innato vengono allertate della presenza di cellule tumorali crescenti dai segnali determinati dalla distruzione tissutale creata per esempio dall'angiogenesi tumorale e dall'infiltrazione tumorale nei tessuti circostanti. Il rimodellamento tissutale di queste prime fasi può produrre molecole pro-infiammatorie che, assieme alle chemochine

prodotte anche dalle stesse cellule tumorali, richiamano le cellule del sistema innato verso la fonte di “pericolo”. Pensando al “*danger model*” è possibile che le cellule dendritiche funzionino come sentinelle dello stress tissutale, e dei danni e/o trasformazioni cellulari e che il segnale di pericolo prenda la forma di *Heat Shock Proteins* (HSP), di prodotti della distruzione della matrice extracellulare e di fattori pro-infiammatori. Tutto questo può favorire la differenziazione e l’attivazione delle cellule dendritiche attraverso diversi meccanismi che comprendono il cross-talk tra cellule dendritiche e *natural killer* (NK) e in seguito fra cellule dendritiche e cellule T. Natural killer, macrofagi, T-cell, e/o le NK T-cell vengono immediatamente reclutate nel sito di “pericolo” e riconoscono le molecole (come i ligandi NKG2D indotti dallo stress tissutale) che sono state indotte sulla superficie delle cellule tumorali sia dalla crescente infiammazione sia dal processo di trasformazione cellulare proprio del tumore; iniziano a produrre effettori citotossici ed Interferoni che amplificheranno la risposta immune successiva. La liberazione degli antigeni tumorali che ne deriva porterà la risposta immune da innata ad adattativa e le cellule dendritiche immature richiamate in loco si attiveranno sia per opera delle citochine rilasciate sia per l’interazione con le NK infiltranti il sito tumorale, inizieranno l’*uptake* degli antigeni tumorali e matureranno per poi migrare ai linfonodi drenanti per eseguire il *priming* dei linfociti T-helper1 CD4+ *naive* tumore specifici. Questi ultimi infine promuoveranno lo sviluppo dei linfociti T CD8+ citotossici tumore specifici indotti dalla cross presentazione specifica delle cellule dendritiche. Infine i linfociti T tumore specifici raggiungeranno il sito tumorale dove potranno espletare la loro funzione citocida.

2.2 Immunità innata e adattativa

La maggior parte dei tumori si sviluppa dalle cellule epiteliali. Negli epitelii troviamo una popolazione di linfociti T intraepiteliali (IEL), capaci sia della lisi cellulare sia di secernere citochine. Questi linfociti si attivano tramite il loro recettore NKG2D e lisano le cellule che esprimono MHC *like* A e B (MICA/MICB): espressione quasi assente sulle cellule epiteliali normali e molto alta nelle cellule tumorali epiteliali.

Se da una parte esiste una ampia evidenza del ruolo dei linfociti NKG2D+ nell'immunosorveglianza, più controverso è invece quello svolto dalle NK. Sicuramente questi ultime sono in grado di riconoscere e distruggere cellule tumorali soprattutto se queste hanno una ridotta espressione di HLA-I; anche le NK hanno i recettori NKG2D e forse è proprio tramite questo che si può estendere ai NK un ruolo nell'immunosorveglianza. Oltre alle NK si possono aggiungere i NK T: una sottopopolazione linfocitaria capace di produrre citochine e lisi cellulari ed in grado di esprimere sia il T-Cell Receptor (TCR) sia i tipici recettori delle NK (TCR a bassa variabilità con riconoscimento antigenico ristretto da CD1d). Infine alcuni studi portano a pensare che esistano almeno 2 popolazioni diverse di NK-T, una CD4+ capace di produrre Interleuchina-13 con azione immunosoppressiva e una CD4- che produce Interferon- γ ad azione immunostimolante.

Il ruolo cruciale del passaggio tra risposta innata e adattativa è svolto dalle cellule dendritiche. Membri del sistema immunitario innato la loro funzione principale è quella di presentare gli antigeni per dirigere e regolare l'attivazione della risposta adattativa. Le cellule dendritiche quindi possono fornire segnali sia di immunostimolazione sia di tolleranza ai linfociti T antigene specifici determinando quindi quale dovrà essere la risposta T (T-helper1/T-helper2) che dipende dallo stato di attivazione delle cellule dendritiche nel momento dell'interazione. E' il microambiente (segnali di pericolo endogeni o esogeni con i *pattern* di trasmissione di segnale attivati dai recettori tipo i Toll-like che si trovano sulle cellule dendritiche) che determina lo stato di maturazione delle cellule dendritiche e di conseguenza il tipo di risposta che avverrà. La presentazione di antigeni *self* da parte di cellule dendritiche non completamente mature induce tolleranza e induce linfociti T regolatori. Esistono svariate evidenze che il tumore sia in grado di interagire e manipolare questo microambiente a suo vantaggio. Anche se non è da sottovalutare il ruolo dei linfociti B e la produzione di anticorpi specifici contro antigeni tumorali, il ruolo principale nell'immunoterapia contro i tumori è giocato dai linfociti T. Sono infatti i linfociti T CD8+ citotossici a essere capaci di riconoscere e distruggere le cellule tumorali in modo specifico. Esiste una popolazione particolare di linfociti: i linfociti T CD4+CD25+ con azione regolatoria. Questi linfociti sono capaci di inibire i linfociti T sia

CD4+ che CD8+ tramite la produzione di citochine immunosoppressive come Interleuchina-10 o TGF β (*Trasforming Growth Factor* $-\beta$) oppure tramite un contatto diretto cellula-cellula tramite il CTLA-4 (*Cytotoxic T lymphocyte-associated Antigen-4*).

Studiati inizialmente nelle malattie autoimmuni dove hanno un ruolo di sorveglianza e immunosoppressione verso le risposte immunitarie contro antigeni *self*, si trovano ora al centro dell'attenzione per chi studia l'immunologia dei tumori. Sta emergendo infatti un loro ruolo chiave come immunosoppressori della risposta anti-tumorale, pegno forse della mancata distruzione tissutale autoimmune che loro stessi impediscono.

2.3 Evasione

I meccanismi di evasione tumorale si possono dividere in 2 grossi gruppi: meccanismi tumore-intrinseci (antigeni cellulari) e meccanismi estrinseci associati al sistema immunitario dell'ospite. Il primo gruppo include

- Down-regolazione o espressione di geni legati alla presentazione degli antigeni tumorali
- Assenza delle molecole MHC classe II o delle molecole co-stimolatorie
- Down-regolazione o assenza delle molecole MHC classe I
- Bassi livelli di esposizione di antigeni tumorali nelle prime fasi di crescita
- Perdita di epitopi antigenici
- Barriere fisiche che impediscono alle cellule effettrici di avvicinare le cellule tumorali
- Mancata risposta agli interferoni

Il secondo gruppo invece include:

- Invisibilità
- Fenomeni di tolleranza indotta dalle antigen presenting cell (APC). Dalle cellule mieloidi o dai linfociti T regolatori
- Soppressione e blocco funzionale dei linfociti T ad opera di fattori derivanti dal tumore stesso (citochine per esempio o espressione di molecole pro-apoptotiche)

- Secrezione di ligandi solubili che bloccano l'attivazione leucocitaria
- Difetti nella presentazione antigenica da parte delle APC
- Alterata maturazione delle APC

2.4 Il sistema HLA

Il sistema immunitario quindi è in grado di riconoscere ed attaccare le cellule tumorali ma il tumore è capace, a sua volta, di indurre tolleranza e anergia, ovvero uno stato di non-risposta antigene-specifica nel proprio ospite. Esistono inoltre, ormai ampiamente studiati, svariati meccanismi di evasione tumorale dal sistema immunitario.

Si va dalla perdita degli antigeni specifici alla down-regolazione o perdita totale delle molecole HLA-I, dall'espressione di molecole alternative come HLA-G, HLA-E dimostrate per esempio in cellule di melanoma, alla mancata espressione delle molecole co-stimolatorie, come per esempio B7.

2.5 Linfociti T Regolatori

I linfociti T regolatori (Treg) sono una sottopopolazione di linfociti T specializzati nel sopprimere l'attivazione del sistema immunitario verso auto-antigeni e quindi mantengono la tolleranza al *self*. Le cellule Treg rappresentano circa il 10% dei linfociti T CD4+ e si caratterizzano principalmente per l'espressione di CD25 (catena α del recettore di IL-2) e il fattore trascrizionale Foxp3. Altri marcatori fenotipici secondari sono: CD62L, recettore di *homing* verso i linfonodi, CD127 (catena α del recettore di IL-7) che non è presente sulle Treg. Queste cellule sono naturalmente legate alle malattie autoimmuni: Sakaguchi ha descritto l'esistenza di linfociti T CD4+ CD25+ in grado di sopprimere le cellule T CD4+ CD25 che inducevano malattie autoimmuni organo-specifiche, ma recentemente si è visto che possono sopprimere anche la risposta immune contro antigeni o patogeni esterni (13). Visto che il cancro si sviluppa come parte del *self*, queste cellule regolatorie sembrano regolare anche la risposta immune anti-tumorale (14). Sono fondamentali per la tolleranza verso gli antigeni *self* e quindi cruciali nel prevenire lo sviluppo di malattie autoimmuni, ma anche probabilmente responsabili della inefficacia della risposta immune antitumorale (15). Queste cellule sono in grado di inibire sia le T CD4+ sia le T CD8+ ed esprimono, oltre al CD25, il CTLA-4, producono IL-10 e TGF β e

inibiscono la produzione di INF γ da parte dei linfociti T CD4⁺ CD25⁻ (16-17). L'IL-2 e le cellule dendritiche sono tra i maggiori attivatori e induttori di proliferazione di queste cellule che potrebbero essere considerate uno spiacevole "effetto collaterale" di vaccinazioni che prevedano l'utilizzo di queste due strategie. Rosenberg ha infatti pubblicato i dati di una osservazione: nei pazienti trattati con IL-2 ad alte dosi aumenta il numero dei linfociti T regolatori circolanti CD4⁺ CD25⁺ Foxp3 (18). A tutt'oggi già molti studi evidenziano l'aumento del numero delle Treg sia nel sangue periferico sia nei linfociti che infiltrano la massa tumorale dei pazienti affetti da cancro, il numero inoltre aumenta con l'aumentare dello stadio di malattia (si passa da un 4.7% nei pazienti sani ad un 12.5% nei pazienti malati) (19-23). Alcuni di questi studi dimostrano inoltre, che oltre ad aumentare di numero, queste cellule sono perfettamente funzionanti nell'inibire la funzionalità delle cellule T CD4⁺, esprimono CTLA-4 ed i markers di memoria come il CD45RO, producono TGF β e IL-10 ma non INF γ (24). In modelli animali e nell'uomo si è già potuto dimostrare che l'eliminazione delle cellule T regolatorie CD4⁺ CD25⁺ permette di aumentare la risposta immune antitumorale (25-26). In particolare, recenti scoperte suggeriscono un nuovo ruolo per CD25, in base al quale le molecole CD25 sulle cellule Treg e possibilmente su altre cellule sono in grado di influenzare l'omeostasi delle cellule T mediante la deprivazione di IL-2. Questa recensione esplora questi risultati e li integra nella nostra attuale comprensione dell'omeostasi delle cellule T. È stato osservato che i Treg Th1-like esprimono il fattore di trascrizione Tbet espresso dai T helper 1 mentre i Treg Th17-like esprimono il fattore di trascrizione ROR γ t espresso dai T helper 17.

2.6 Citochine tumorali

Le cellule tumorali producono citochine immunosoppressive come interleuchina-10, interleuchina-4 e TGF β (*Transforming Growth Factor β*).

Producono fattori pro-angiogenetici come VEGF (*Vascular Endothelial Growth Factor*) che è anche un potente inibitore della maturazione delle cellule dendritiche così come il prostaglandina-E₂ e la ciclossigenasi-2. Queste ultime due molecole sono fortemente iperesprese in molti tipi di tumori, stimolano la sintesi di VEGF e inibiscono la produzione delle citochine tipiche T-helper1 come interleuchina-2, interferone- γ , TNF α (*Tumor*

Necrosis Factor- α), spostando la risposta verso la linea *T-helper2*. In alcuni tumori polmonari non a piccole cellule, i fattori solubili dipendenti da ciclossigenasi-2 che includono prostaglandina-E2 promuovono la produzione di interleuchina-10 e inibiscono quella di interleuchina-12.

Le cellule tumorali ancora esprimono in modo eccessivo indolamina-2,3-diossigenasi che sopprime i linfociti T tramite la degradazione del triptofano

2.7 Apoptosi

Le cellule tumorali infine contrattaccano le cellule del sistema immunitario esprimendo molecole che inducono apoptosi nelle cellule che hanno il ligando specifico. Esprimono infatti Fas-L e liberano esosomi contenenti Fas-L, TRAIL e RCAS1, inducendo apoptosi nei leucociti che naturalmente esprimono Fas; esprimono molecole come CD200 (OX-2), segnale tollerizzante che inibisce i linfociti T citotossici e favorisce lo *shift T-helper1* verso *T-helper2*. In definitiva i tumori che arrivano ad essere evidenti clinicamente hanno sviluppato a sufficienza meccanismi attivi per spostare il bilancio dell'immunità dall'immunosorveglianza alla immunotolleranza. Sono quindi in grado di creare intorno a loro un livello di immunità assolutamente non letale

3. EVASIONE TUMORALE

I tumori sviluppano strategie per evadere all'immunosorveglianza come la perdita degli antigeni specifici, la *down*-regolazione o perdita totale delle molecole HLA-I, l'espressione di molecole alternative come HLA-G, HLA-E. E' dimostrato nelle cellule di melanoma, la mancata espressione delle molecole co-stimolatorie (27-30). Le cellule tumorali producono citochine immunosoppressive come Interleuchina- 10, interleuchina-4 e *Trasforming Growth Factor- α* , (TGF- α) fattori pro-angiogenetici come VEGF (*Vascular Endothelial Growth Factor*) che è anche un potente inibitore della maturazione delle cellule dendritiche così come la prostaglandina E2 e la ciclossigenasi-2. Impedire alle CD di presentare gli antigeni in forma attiva ai linfociti, costituisce probabilmente un altro dei principali meccanismi messi in atto dal tumore per sottrarsi dall'attacco dei linfociti T CD8+. Inoltre le cellule NK infatti sono in grado di indurre l'apoptosi delle cellule tumorali,

offrendo in tal modo al tumore la possibilità di sfuggire alla risposta immunitaria di difesa (31). L'*uptake* di materiale apoptotico infatti viene indicato come probabile meccanismo di *escape* immunitario messo in atto dal tumore. Le cellule tumorali ancora esprimono in modo eccessivo l'enzima lamina-2,3-diossigenasi che sopprime i linfociti T tramite la degradazione del triptofano. (32-34).

Le cellule tumorali infine contrattaccano le cellule del sistema immunitario esprimendo molecole che inducono apoptosi nelle cellule che hanno il ligando specifico. Esprimono infatti Fas-L e liberano esosomi contenenti Fas-L, TRAIL e RCAS1, inducendo apoptosi nei leucociti che naturalmente esprimono Fas; esprimono molecole come CD200 (OX-2), segnale tollerante che inibisce i linfociti T citotossici e favorisce lo *shift* T- helper1 verso T-*helper*2. In definitiva i tumori che arrivano ad essere evidenti clinicamente hanno sviluppato a sufficienza meccanismi attivi per spostare la bilancia dell'immunità dall'immunosorveglianza alla immunotolleranza. Sono quindi in grado di creare intorno a sé un livello di immunità assolutamente non letale (35-38).

4. RADIOTERAPIA E ABSCOPAL EFFECT

E' stato dimostrato negli ultimi anni il ruolo immunomodulante dei trattamenti a base di radiazioni ionizzanti. La radioterapia (RT) inevitabilmente coinvolge anche i tessuti sani adiacenti al tumore e comporta come conseguenza ad un rapido rinnovo degli stessi. Inoltre, l'interazione tra tumore e tessuto sano porta alla produzione di radicali liberi dell'ossigeno (ROS), citochine e fattori di crescita come IL-1 β e *Tumor Necrosis Factor α* (TNF α), tutti elementi che promuovono processi infiammatori cronici e l'*homing* linfocitario. E' stato dimostrato che la RT su una lesione tumorale può avere effetti anche su lesioni metastatiche distanti dal sito di irraggiamento stesso; quest'effetto è chiamato "*Abscopal Effect*" (AE). Come precedentemente indicato la RT causa lesioni nel microambiente tumorale e nei tessuti sani che circondano lo stesso nonché nella vascolarizzazione locale; questo ambiente promuove l'apoptosi via Fas/CD95. Viene inoltre favorito un forte *cross-priming* tra linfociti T e cellule dendritiche come conseguenza della liberazione di antigeni tumore associati (TAA) nel torrente circolatorio

a seguito del danneggiamento tissutale, ne consegue quindi la captazione da parte dei precursori immunologici che, presentando via MHC-I, sono alla base di tale fenomeno. L'AE si è potuto osservare anche in assenza di stimoli immunologici addizionali. Analisi sierologiche hanno inoltre evidenziato elevati livelli di TNF α e di interferone β (IFN- β), post radioterapia.

Si è osservato che l'AE avviene con più frequenza dei pazienti giovani (età ≤ 55 anni) e con elevato infiltrato linfocitario (TIL) nella sede tumorale. Pare inoltre che anche i macrofagi si attivino in maniera aspecifica in sedi metastatiche distanti dal campo d'irraggiamento a seguito del trattamento radioterapico.

5. INTERLEUCHINA-2

L'interleuchina 2 (IL-2) è una citochina di 15 kd composta da 4 corte α -eliche ed è prodotta prevalentemente dall'attivazione dei T CD4+, ma anche dai T CD8+, dalle *natural killer* (NK) e dalle cellule dendritiche (DC) attivate. Ha sia attività autocrina che paracrina e suo recettore è IL-2R. L'IL-2 svolge un ruolo fondamentale nella regolazione del sistema immunitario adattivo controllando la sopravvivenza e la proliferazione delle cellule Treg, che sono necessarie per il mantenimento della tolleranza immunitaria. Inoltre l'IL-2 è implicata nella differenziazione e omeostasi dei sottogruppi di cellule T effettrici, tra cui TH1, TH2, TH17 e cellule T CD8 + di memoria. IL-2R è composto da 3 subunità distinte, vale a dire le catene α (CD25), β (CD122) e γ (γ c). La principale fonte di IL-2 rimangono comunque le stesse cellule T in via di maturazione in seguito all'interazione con l'antigene presentato da una APC. In particolare l'interazione delle molecole stimolatrici della famiglia di B7, presente sulla cellula dendritica e il CD28 presente sui linfociti determina un aumento di circa trenta volte la produzione della citochina.

Il recettore di IL-2 è una molecola eterotrimerica presente nella forma completa solo su linfociti attivati dall'incontro con l'antigene. Le tre subunità sono chiamate alfa, beta e gamma ed hanno un peso di 55, 75 e 64 kD rispettivamente. In condizioni normali solo le subunità beta e gamma sono presenti, questo complesso mostra una bassa affinità per il ligando che deve essere pertanto molto concentrato per potersi legare. In caso di

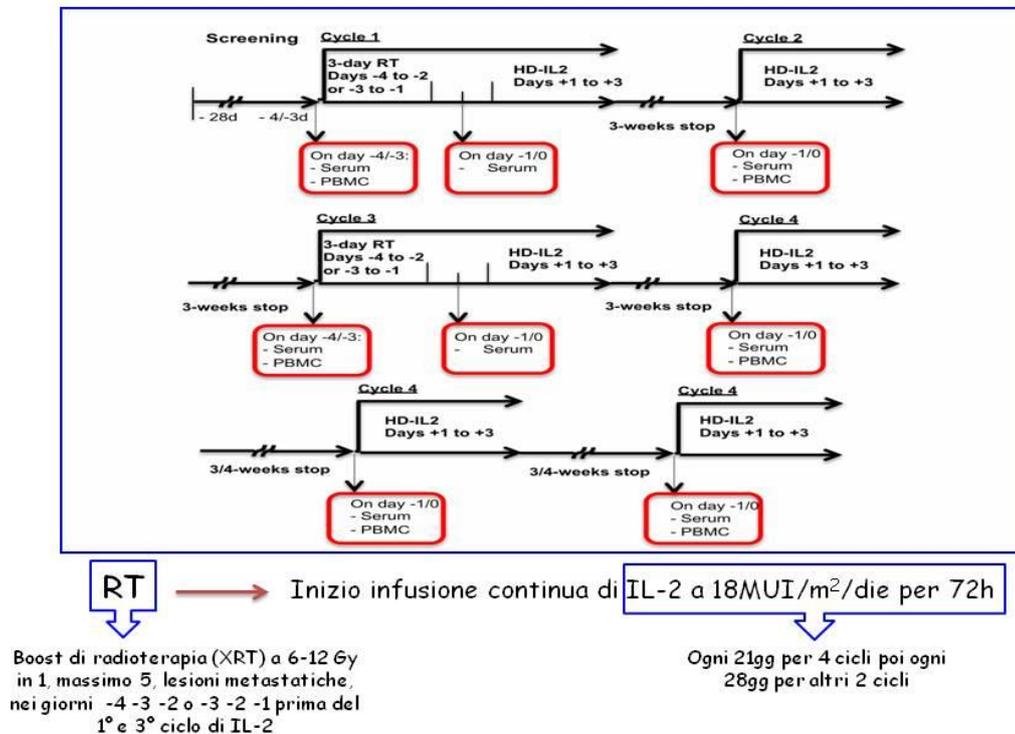
attivazione della cellula abbiamo la sintesi della subunità alfa che in tal modo si associa formando il trimero ad elevata affinità. Possiamo quindi affermare che le subunità normalmente presenti sono quelle necessarie e sufficienti per la trasmissione del segnale mentre l'esclusivo seppur fondamentale ruolo di alfa è quello variare la costante di dissociazione. Stimola il processo di espansione clonale e aumentata la sopravvivenza cellulare tramite la sintesi della proteina BCL-2; stimola le NK sia per la proliferazione sia per l'attività citotossica. Esercita attività sulle cellule B, aumentandone la replicazione e stimolando la produzione di anticorpi.

6. RAZIONALE E DISEGNO DI STUDIO

L'interleuchina ad alte dosi (HDIL-2) è un farmaco in grado di indurre (in prima linea), un 15-17% di risposte obiettive in pazienti affetti da melanoma e RCC, con un 6-8% di risposte complete; è una valida opzione terapeutica nonostante l'avvento delle nuove terapie target e la nota tossicità, determinata dalla non selettività del farmaco. Sono diversi gli schemi terapeutici proposti al fine di individuare la schedula con minor tossicità farmaco correlata rispetto alla schedula di Rosenberg; più autori difatti hanno testato schemi terapeutici con HDIL-2, tra cui Quan et al. che hanno testato 72 ore di infusione continua ripetuta ogni 21-28 giorni dimostrando sia efficacia clinica sia tossicità più contenuta; per questo motivo la schedula di Quan è quella seguita in questo protocollo clinico. L'RT sul tumore è in grado di promuovere l'AE e l'attivazione del sistema immunitario su metastasi non localizzate nel campo di irradiazione; insieme questi dati, indicano che la radioterapia associata ad HDIL-2 potrebbe promuovere risposte immuni, e da qui la nascita di questo protocollo clinico. I pazienti a cui è rivolto questo studio, in corso presso l'IRCCS IRST di Meldola (FC), sono affetti da melanoma e RCC a cellule chiare. Lo studio è un fase II "*proof of principle*", i cui obiettivi primari sono rappresentati dalla valutazione dell'efficacia immunologica e dall'identificazione di marcatori predittivi di risposta clinica. Lo schema di trattamento prevede un *boost* radioterapico con una dose di 6-12 Gy erogata in 3 giorni su almeno 1 (massimo 5) lesione metastatica nei giorni (giorni da -4 a -2 o da -3 a -1) prima del primo e del terzo ciclo di terapia con IL-2. Il trattamento

con IL-2 inizia il giorno +1 e viene ripetuto ogni 3 settimane per 6 cicli. La dose di IL-2 è 18MIU/m²/die in 500cc in infusione continua per 72 ore, associata a farmaci ancillari (antiemetici, desametasone 4mg ogni 8 ore per contrastare la *capillary leak syndrome*, paracetamolo e idratazione continua con 1000 ml/die di soluzione fisiologica). Il trattamento viene eseguito in regime di ricovero c/o la degenza ordinaria oncologica IRCCS IRST. Il monitoraggio del paziente in trattamento prevede la rilevazione dei parametri vitali ogni 6 ore, esami del sangue giornalieri per l'emocromo, funzionalità epatica renale, elettroliti, bilancio idrico ogni 12 ore. Per rispondere agli *end point* primari sono previste biopsie tumorali al basale ed alla fine del trattamento, prelievi ematologici per la raccolta di PBMC nei giorni -3/-4 (pre-radioterapia) del primo e terzo ciclo di IL-2 e nei giorni -1/0 di tutti i cicli in concomitanza ai prelievi sierici. La risposta clinica viene valutata ogni 2 cicli con TC *total body* durante il trattamento e ogni 3 mesi dalla fine del trattamento fino all'uscita dallo studio. La schedula di trattamento è riportata in figura 1.

Figura 1: schedula di trattamento



6.1 Disegno Statistico

Lo studio segue il disegno a due step di Simon.

Step 1: arruolamento dei primi 7 pazienti. Nel caso in cui il trattamento non induca un aumento della risposta immune antigene-specifica (valutato con IFN- γ ELISPOT) in almeno il 40% dei pazienti lo studio verrà interrotto; nel caso in cui il trattamento sperimentale induca risposte immuni specifiche in almeno il 70% dei pazienti si passerà al secondo step dello studio. Pertanto, utilizzando errori alfa e beta dello 0.10, se il trattamento indurrà aumento della risposta immune specifica per antigeni tumorali in almeno 3 pazienti su 7 durante il primo step lo studio proseguirà.

Step 2: arruolamento di ulteriori 12 pazienti per un totale finale di 19 pazienti valutabili. Sul totale di 19 pazienti il trattamento verrà considerato attivo se avrà indotto un aumento della risposta immune antigene-specifica in almeno 11 pazienti.

Gli obiettivi primari dello studio sono rappresentati da:

- valutazione dell'efficacia immunologica della terapia combinata RT/HDIL-2 (tramite IFN- γ ELISPOT) in termini di aumento della porzione circolante di cellule effettrici specifiche per antigeni tumorali noti;
- valutazione prospettica del valore predittivo di biomarcatori pre-trattamento in grado di identificare i casi che potranno beneficiare del trattamento RT/HDIL-2.

Gli obiettivi secondari sono rappresentati dalla valutazione di tossicità, tasso di risposte (RR), e sopravvivenza globale (OS); tutti gli obiettivi clinici tempo-dipendenti (RR and OS) saranno valutati col metodo Kaplan-Meier.

6.2 Criteri di inclusione ed esclusione

Criteri di Inclusione

- Pazienti con melanoma o RCC metastatico e istologicamente confermato

- Precedenti linee per malattia avanzata (chemioterapia, immunoterapia o terapia biologica) devono essere terminate almeno 4 settimane prima dell'inserimento in studio
- Maschi o femmine ≤ 18 anni
- ECOG performance status ≤ 1
- Funzionalità epato-renale nella norma o entro limiti definite nel protocollo.
- ECG ed ecocardio nei limiti
- Nessuna controindicazione all'eventuale utilizzo di farmaci vasopressori
- Consenso informato scritto

Criteri di esclusione

- Stadi I o II
- Pazienti con metastasi cerebrali
- Anamnesi positive per allergie a IL-2 o ad altri farmaci previsti dal trattamento.
- Qualsiasi malattia autoimmune che può essere esacerbata da IL-2
- Qualsiasi malattia concomitante che richieda uso cronico di corticosteroidi
- Positività per HIV.

7. MATERIALI E METODI

7.1 Caratteristiche dei pazienti e raccolta campioni

Ad oggi sono stati arruolati e clinicamente valutati 16 pazienti di cui 8 con carcinoma renale a cellule chiare e 8 con melanoma (4 uveali e 2 mucosali), con età mediana di 55 anni (35-72). La dose media/die di IL-2 è stata di 33448 UI, con una media di 4 cicli somministrati per paziente. L'interruzione precoce del trattamento è stata in tutti i casi per progressione di malattia e mai per tossicità. Tutti i pazienti, tranne 1, avevano almeno 2 pregresse linee di terapia per malattia avanzata. Le tempistiche sia di trattamento con le alte dosi che per la radioterapia sono state rispettate per tutti i pazienti arruolati.

Le valutazioni dei biomarcatori sono state condotte, come da disegno di studio, sui primi 7 pazienti arruolati.

Le cellule mononucleate periferiche (PBMC) necessarie alle valutazioni in citofluorimetria e con metodo ELISPOT, sono ricavate con metodo *Ficoll Paque* in sterilità da 50ml di sangue intero raccolti in provette contenenti EDTA. Il sangue viene diluito 1:2 con terreno RPMI e 30 ml di diluizione sono dispensate in provette da 50 ml; vengono quindi aggiunti alla diluizione 15 ml di terreno Lymphosep (Biowest) facendo attenzione a non miscelare il sangue con il terreno separatore di linfociti. Si effettua una centrifugazione a 2000 rpm per 30' quindi viene raccolto l'anello di PBMC separato dal sangue intero grazie alla centrifugazione su gradiente. Le cellule vengono quindi lavate con RPMI, contate, aliquotate in vial e criopreservate in vapori d'azoto con una miscela di siero umano +10% DMSO fino all'utilizzo per il test. I campioni per la raccolta del siero sono collezionati all'interno di provette contenete "gel-clot" mentre i campioni per la separazione del plasma sono raccolti in provette con EDTA: siero e plasma sono ottenuti per centrifugazione delle relative provette a 2500 rpm per 15' quindi conservati a -80°C in vial fino all'utilizzo. Le biopsie pre e post terapia, vengono effettuate presso gli ambulatori di chirurgia e conservate in blocchetti di paraffina presso la UO Anatomia Patologica Ospedale Morgagni Pierantoni di Forlì.

7.2 ELISPOT Assay

Per effettuare questa valutazione è stato eseguito il test IFN gamma ELISPOT e le PBMC prelevate ai pazienti durante il trattamento, vengono stimulate con un *pool* di peptidi overlappanti che coprono l'intera sequenza di tirosinasi, gp100, Mart-1 (per il melanoma), di 5T4, CAIX/G250, EGF-R per il carcinoma renale, e di MAGE-A3, NY-ESO1 e survivina (per entrambi i tipi tumorali). I *pool* di peptidi per gli antigeni tumorali 5T4, CAIX e EGFR sono stati prodotti mediante metodica Fmoc con purezza superiore al 70% da Mimotopes Pty Ltd, Victoria, Australia. I *pool* di peptidi per gli antigeni MAGE-A3, Melan-A/MART-1, Melanocyte protein Pmel 17gp100, NY-ESO-1, survivina e tirosinasi sono prodotti e commercializzati da JPT Technology, Berlin, Germany. 10^5 PBMC di ogni campione diluite

in 100µl di RPMI vengono distribuiti in una piastra 96 pozzetti con membrana in PVDF, precedentemente attivata con Coating Ab e addizionate con i peptidi diluiti in RPMI a concentrazione di 1µg/ml. La piastra viene incubata 22-24 ore a 37°C, 5% CO₂, successivamente viene lavata con PBS 1x + 0.05% tween20 quindi incubata per 1 ora a 37°C, 5% CO₂ con Detection Ab. Terminata l'incubazione la piastra viene nuovamente lavata con PBS 1x + 0.05% tween20 quindi incubata per 1 ora a 37°C, 5% CO₂ con Streptavidina HRP. Terminata incubazione la piastra è lavata con PBS 1x + 0.05% tween20 quindi incubata per 30' a temperatura ambiente con AEC Coloring System. A reazione conclusa la piastra viene lavata con acqua di fonte e asciugata per la lettura. Il test è stato effettuato utilizzando un kit commerciale Human IFN gamma ELISPOT (U-Cytech, Utrecht, The Netherlands). Come controllo positivo sono state utilizzate le cellule del paziente stimulate con il *pool* di controllo CEF (CEF pool, JPT Technology); come controllo negativo le cellule sono state incubate con il terreno RPMI. La lettura dei saggi è stata effettuata utilizzando il lettore Eli.Expert (Hannover, Germany) e vengono lette le SFC (*Spot Forming Cells*) e il software A.EL.VIS GmbH (versione V 5.1, Hannover, Germany). Tutti i campioni e i controlli sono in quadruplicato.

7.3 Valutazione immunoistochimica dell'espressione di antigeni tumorali in biopsie pre e post-trattamento

Le sezioni su cui effettuare l'analisi vengono tagliate al microtomo dai blocchetti paraffinati contenenti le biopsie pre e post terapia e posizionate su vetrini portaoggetto. Le sezioni vengono successivamente sparaffinate con xilene e etanolo a concentrazioni decrescenti quindi reidratate con acqua per preparazioni iniettabili. Le sezioni vengono poi posizionate in un bagno caldo a 78°C con tampone EDTA pH9 per lo smascheramento degli epitopi. Successivamente le sezioni vengono etichettate con un codice a barre generato dallo strumento, necessario all'identificazione del vetrino e posizionate nel vano porta vetrini dello strumento Ventana Benchmarck XT.

Le colorazioni immunoistochimiche sono state effettuate utilizzando i seguenti anticorpi: anti gp100 clone HMB45, anti MART-1 clone A103, anti tirosinasi clone T311, anti survivina clone 12C4 (DAKO) anti MAGEA3 clone 1H1, anti CTAG1B/NY-ESO clone 4D8 (Abcam), e

anti G250/CA-IX policlonale (Abcam), utilizzando i sistemi di rilevazione Optiview DAB IHC detection kit e Ultraview AP Fast red (Ventana–Roche) su sistema automatizzato Ventana Benchmark XT. Gli anticorpi e i reagenti vengono quindi inseriti negli appositi flaconi posizionati sul carrello dello strumento che, a secondo del programma impostato, esegue il test. Per ogni determinazione sono stati utilizzati gli appropriati controlli positivi e negativi.

7.4 Effetti indotti dal trattamento sperimentale sulle sottopopolazioni T circolanti

Il fenotipo funzionale dei linfociti effettori circolanti è stato effettuato sulle PBMC raccolte in 3 tempi prelievo comuni a tutti i pazienti, ovvero prima e dopo ogni trattamento radioterapico o somministrazione di IL-2 ad alte dosi, ed è stato analizzato attraverso la citometria a flusso policromatica. L'analisi citofluorimetrica è stata eseguita utilizzando i seguenti anticorpi monoclonali e gli appropriati controlli isotipici: anti-CD3 PercP-Cy5.5, anti-CD45RA APC-Cy7 (Biolegend), anti-CD4 FITC, anti-CD8 FITC, anti-CCR7 PE, anti-CD25 FITC (BD Biosciences), Anti-Foxp3 APC (Miltenyi Biotec). 3×10^5 PBMC vengono incubate al buio a +4°C per 30' con 5µl di anticorpo diluito secondo *data sheet*, quindi lavate per 2 volte in PBS 1X, centrifugate a 1200 rpm per 5', risospese con PBS 1X nelle apposite provette per citometria e acquisite utilizzando lo strumento FACS Canto I; i dati sono analizzati con il software Diva (BD Biosciences).

7.5 Effetto del trattamento sperimentale sui livelli sierici di VEGF, fibronectina, e citochine proinfiammatorie

I livelli sierici dei due marcatori pro-angiogenici VEGF e Fibronectina sono stati valutati tramite metodica immuno-enzimatica ELISA seguendo le indicazioni tecniche fornite dal produttore (Human VEGF Quantikine ELISA e Human Fibronectin Quantikine ELISA, R&D systems). Reagenti, standard e campioni vengono direttamente allestiti nella piastra 96 pozzetti del kit. 100µl di Assay Diluent sono inseriti in ogni pozzetto con 100µl di standard e campione, quindi vengono incubati a temperatura ambiente per 2 ore; terminata

l'incubazione la piastra viene lavata per 3 volte e addizionata di 200µl/pozzetto di Substrate Solution quindi incubata a temperatura ambiente per 25'; a reazione terminata si aggiungono 50µl di Stop Solution e la piastra viene letta a lunghezza d'onda compresa tra i 540 e 570nm. Tutti i campioni e gli standard sono valutati in duplicato. L'assorbanza misurata per ogni campione viene confrontata con una curva standard creata con il software Microsoft Excel ponendo sull'asse delle X le concentrazioni degli standard e sull'asse delle Y le relative assorbanze. Il coefficiente di linearità (R^2) che mostra la correlazione lineare tra l'assorbanza misurata e la concentrazione nota degli standards è risultata pari ad almeno 0.99 sia per il VEGF che per la Fibronectina.

La valutazione dei livelli sierici di IL-1 β , IL-6, IL-8, IL-10, IL-12p70, TNF α durante il trattamento è stata effettuata "in service" da Tema Ricerca con metodica immunoenzimatica ELISA in chemiluminescenza seguendo le indicazioni tecniche fornite dal produttore (Ciraplex TM immunoassay kit, Aushon); tale kit permette la valutazione simultanea di multiple citochine. Tutti i campioni e gli standard sono stati valutati in duplicato. La lettura delle piastre è stata eseguita con lo strumento Aushon Cirascan TM, successivamente i dati sono stati elaborati mediante il software Aushon Cirasoft TM Analyst Software. Il coefficiente di linearità (R^2) che mostra la correlazione lineare tra la chemiluminescenza misurata e la concentrazione nota degli standards è risultata pari ad almeno 0.99 per tutte le citochine analizzate.

8. DISCUSSIONE E RISULTATI

Rispetto ai 7 casi su cui sono state condotte le analisi, sono stati arruolati ulteriori pazienti che però non sono stati valutati in termini di biomarcatori poiché la raccolta dei campioni biologici è stata effettuata in maniera errata, per ragioni non legate al protocollo. Questi pazienti sono stati egualmente valutati clinicamente. Sono state osservate 1 CR (35+ mesi), 1 PR (9 mesi), 5 SD (6+, 6+, 4+, 5 e 2 mesi), e 9 PD, con una sopravvivenza mediana di 6 mesi (2-37 mesi). Le risposte cliniche obiettive sono state osservate esclusivamente nei carcinoma renale, mentre stabilizzazione di malattia è stata riscontrata in 3 pazienti con melanoma e in 2 pazienti con carcinoma renale. Circa la tossicità, è stato osservato un

solo evento di grado 4 (linfopenia), mentre in quattro casi si sono verificati eventi avversi che hanno necessitato di ospedalizzazione (SAE), di cui tre legati alla progressione della malattia di base ed uno legato al trattamento (*capillary leak syndrome*); le tossicità di grado 3 sono riscontrate sono state: orticaria, diarrea, eritema e nausea; legate alla patologia di base o alla progressione della stessa. La maggior parte delle tossicità rilevata è stata di grado lieve-moderato (G1-2) ed era costituita da febbre, nausea e vomito, oliguria, prurito, rash e diarrea, confermando per tanto la validità della scheda sul contenimento della tossicità. È emerso che i casi affetti da RCC hanno risposte cliniche migliori rispetto ai pazienti affetti da melanoma così come è emerso che nel gruppo dei melanomi, i risultati clinici più interessanti in termini di sopravvivenza sono nei casi di melanoma uveale e non nel melanoma cutaneo; questo ha fatto sì che il protocollo clinico fosse emendato per proseguire con l'arruolamento dei soli pazienti affetti da carcinoma renale a cellule chiare; tale emendamento sta conseguentemente ritardando l'arruolamento di ulteriori pazienti poiché il trattamento delle lesioni nel RCC è in prevalenza chirurgico sia per finalità radicalizzante che palliativa.

Per le indagini effettuate sui biomarcatori, i dati raccolti dagli esperimenti condotti sui primi 7 casi, hanno dimostrato che più della metà dei pazienti hanno avuto una risposta positiva e per questo il protocollo è proseguito con il secondo step per l'inclusione di ulteriori 12 pazienti, di cui gli ultimi in fase di reclutamento. Le analisi del secondo gruppo di pazienti saranno effettuate non appena concluso l'arruolamento dell'ultimo paziente, come da protocollo.

L'efficacia immunologica del trattamento è stata valutata principalmente tramite la quantificazione degli effettori circolanti specifici per antigeni tumore associati con metodo ELISPOT; i dati ottenuti con questo metodo hanno dimostrato che il trattamento ha indotto risposte almeno in un prelievo verso un TAA in 6 casi su 7.

E' interessante notare che la sensibilità nei confronti degli TAA cambia da prelievo a prelievo; in figura 2 sono riportati i casi di melanoma che hanno un andamento abbastanza netto in termine di sensibilità ad antigeni tumorali se correlati alla risposta

clinica; i pazienti BP e GG hanno avuto infatti una rapida progressione di malattia e il decesso è avvenuto in tempi ravvicinati. Il paziente LC è interessante perché dal 4° prelievo ha avuto un aumento delle risposte generalizzato ma anche conferma di progressione di malattia; il paziente quando uscito dal protocollo è stato arruolato in altri trial che prevedevano l'impiego di terapie biologiche e a cui ha clinicamente risposto. Non è da escludere questo caso abbia avuto una risposta "abscopal" e che le lesioni apparse nelle immagini durante la stadiazione, dipendessero dall'attivazione del sistema immunitario su micro metastasi non rilevabili nelle immagini precedenti. Per quel che riguarda i RCC, le risposte sono decisamente più variabili, come nel caso del paziente GGi (Fig.3) che ha un progressivo aumento degli effettori anti EGFR fino al 4° prelievo che poi vanno drasticamente a diminuire non ostante il paziente abbia risposto alla terapia e abbia concluso il ciclo di trattamento. Questa variabilità che si osserva in entrambe le patologie molto probabilmente dipende dall'*homing* linfocitario. In Figura 2 e 3 sono riportate le risposte verso TAA rispettivamente nei casi di melanoma e RCC.

Figura 2: Efficacia immunologica valutata in ELISPOT Assay nel melanoma

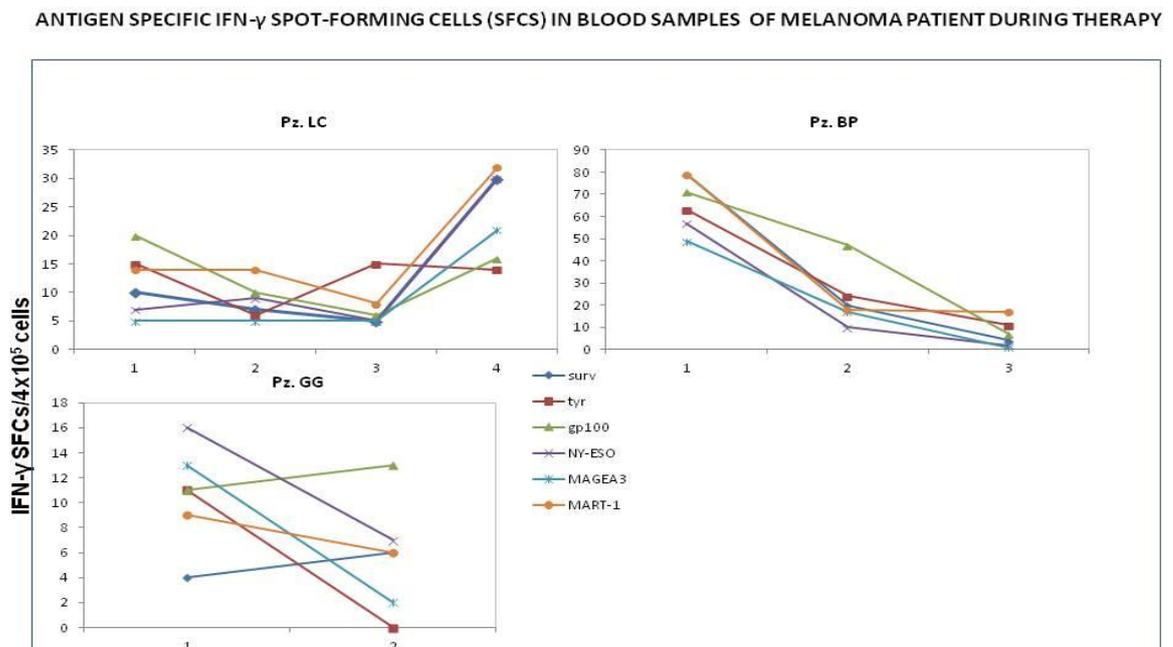
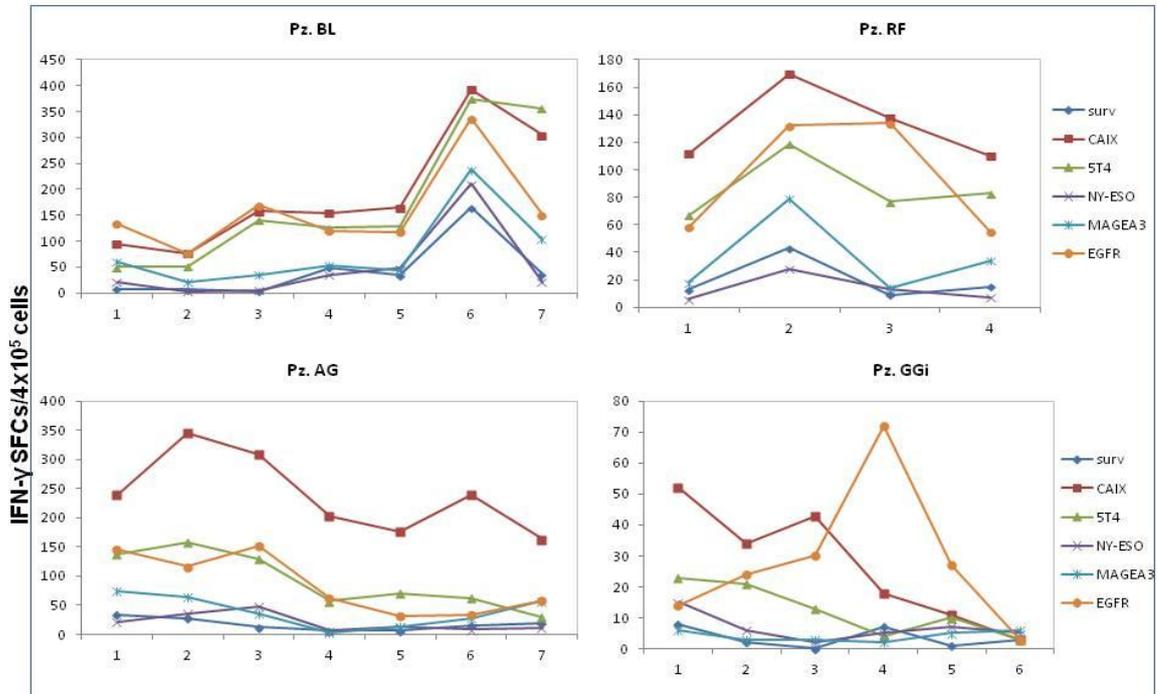


Figura 3: Efficacia immunologica valutata in ELISPOT Assay nel RCC

ANTIGEN SPECIFIC IFN- γ SPOT-FORMING CELLS (SFCs) IN BLOOD SAMPLES OF RENAL CANCER PATIENT DURING THERAPY



Per quel che concerne la ricerca di citochine pro infiammatorie, le analisi sono state eseguite su campioni di siero, raccolti come sopra descritti. A fronte della variabilità dei livelli basali delle citochine valutate, non sono state osservate comunque differenze significative tra i casi di melanoma e RCC; l'analisi dei campioni ottenuti al basale e a fine trattamento, ha evidenziato un incremento dei livelli sierici di tutte le citochine, aumento generalizzato però statisticamente significativo solo per la IL-12. L'IL-12 è il principale mediatore delle risposte innate, ha un ruolo fondamentale nelle risposte cellule mediate favorisce la produzione di IFN- γ da parte di NK e linfociti T, promuove il differenziamento dei CD4 a TH1 e potenzia l'attività citotossica dei CTL. Questo dato è particolarmente interessante poiché sostiene che il trattamento ha indotto risposte immuni, sia innate che adattative. Al termine dell'arruolamento e della raccolta dei dati clinici verrà confermato se i diversi livelli di citochine registrati siano predittivi di risposta al trattamento. Per quel che riguarda i livelli sierici di fibronectina e VEGF, confrontando i prelievi basali e di fine trattamento, s'è osservato che il VEGF incrementa maggiormente nel melanoma rispetto

ad RCC mentre la fibronectina decresce nel solo RCC. Sono stati analizzati i campioni di siero raccolti prima del trattamento e dopo ogni ciclo di radioterapia e di IL-2 ad alte dosi. Le unità di misura sono espresse tutte in pg/ml, fatta eccezione per la fibronectina che viene misurata in mg/ml. I livelli sierici basali di VEGF osservati variavano da un minimo di 155.4 pg/ml ad un massimo di 1169.9 pg/ml (mediana 467.6 pg/ml).

I livelli sierici basali di fibronectina variavano da un minimo di 0,2 mg/ml ad un massimo di 0,4 mg/ml (mediana 0,3 mg/ml).

Confrontando i livelli dei due marcatori prima (BASELINE) e al termine del trattamento (EoT) si è osservato l'incremento dei livelli sierici mediani di VEGF, maggiore nei pazienti con melanoma rispetto ai pazienti affetti da carcinoma renale. Per quanto riguarda i livelli sierici di fibronectina, tale decremento si è osservato solamente nei pazienti affetti da carcinoma renale mentre nei pazienti affetti da melanoma non si sono osservate sostanziali differenze. L'elevato livello di VEGF è un fattore prognostico negativo in ambito oncologico; le valutazioni effettuate sui campioni dimostrano un aumento, seppur non statisticamente significativo, nella casistica valutata. È da considerare se l'incremento del VEGF dipenda non tanto dalla progressione della malattia o per ragioni legate alla sfera oncologica ma dall'effetto indotto a livello endoteliale, dalle alte dosi del farmaco, poiché ne modifica la permeabilità.

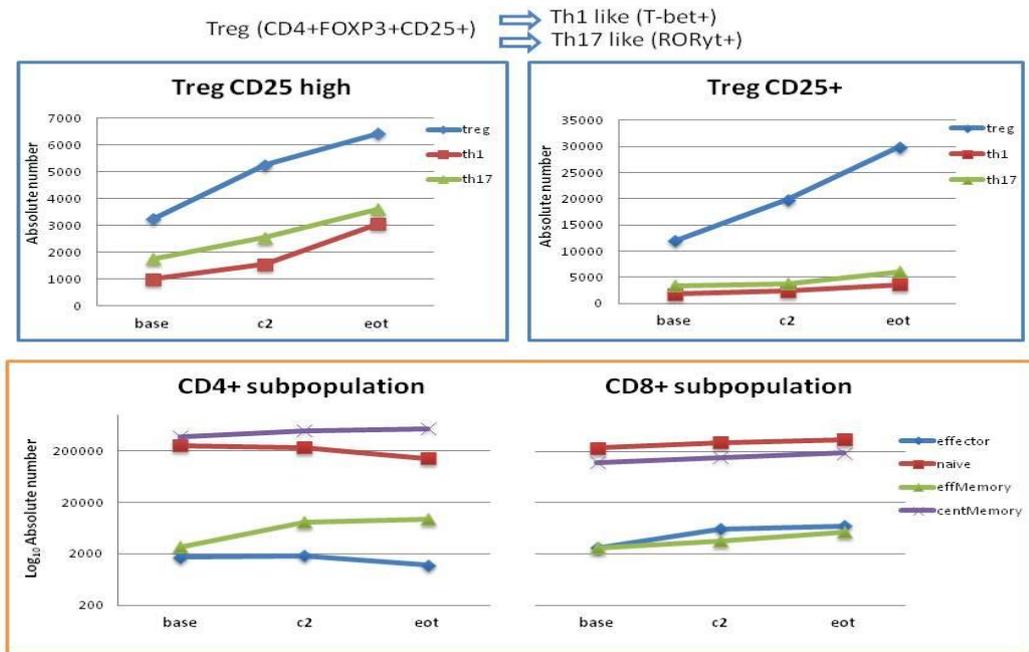
Figura 4: Valutazione citochine pro infiammatorie, VEGF e fibronectina (tutti i casi)

	Baseline Mediana (range)	Pre 2° ciclo Mediana (range)	EOT Mediana (range)
IL-12 p70	0.6 (0-4.0)	0.6 (0.1-10.1)	0.5 (0.1-1.1)
TNFα	1.2 (0-4.4)	3.8 (0.1-4.7)	1.1 (0.1-4.4)
IL-6	6.3 (4.3-11.6)	5.6 (1.6-30.5)	6.2 (2.6-12.6)
IL-8	6.1 (2.4-62.8)	7.8 (2.5-254.4)	4.3 (1.4-11.9)
IL-10	1.5 (0.5-3.6)	2.4 (0.7-5.4)	6.4 (2.5-7.4)
IL-1β	0 (0-1.5)	0.1 (0-1.3)	0.2 (0-0.3)
VEGF	467.6 (155.4-1169.9)	574.90 (127.6-1284)	690.8 (420.8-1014.9)
Fibronectina	0.3 (0.2-0.4)	0.2 (0.1-0.5)	0.2 (0.1-0.3)

L'IL-2 stimola in maniera non selettiva sia i linfociti T CD4, CD8 nonché i Treg e per questo motivo sono state analizzate in citofluorimetria tali popolazioni, al fine di valutare se il farmaco fosse capace di modificare le popolazioni cellulari e in modo particolare, se i casi andati incontro a progressione di malattia avessero un incremento delle Treg. I dati ottenuti non dimostrano variazioni statisticamente significative nella distribuzione delle sottopopolazioni linfocitarie indagate, in seguito al trattamento. Per quel che riguarda i Treg, si è comunque osservato un loro aumento a seguito del trattamento sia per i CD25⁺ che i CD25^{hi}. L'importanza di valutare entrambi i fenotipi deriva dal fatto che le CD25^{hi} sono Treg attivati con maggior capacità soppressiva, funzione che viene mantenuta poiché costitutiva nella popolazione stessa diversamente dai Treg CD25⁺ che a seguito di interazioni con altre popolazioni cellulari o in condizioni pro infiammatorie, come per esempio nella condizione dettata dalla somministrazione delle alte dosi del farmaco, possono modificare l'attività soppressoria; è stato osservato che i Treg CD25⁺, possono

essere anche down regolati per CD25 e divenire Treg CD4+Foxp3. La valutazione delle popolazioni dei Treg al citofluorimetro, e in particolar modo dei CD25^{hi} è ben rilevabile poiché si distinguono bene le popolazioni CD25+ “high”, “intermediate” e “low”.

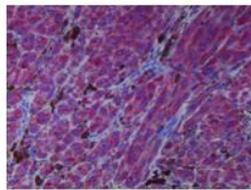
Figura 5: Valutazione citofluorimetrica popolazioni circolanti



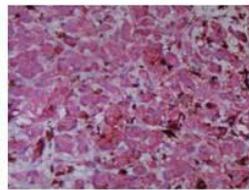
La valutazione immunohistochimica dell'espressione di antigeni tumorali è stata eseguita utilizzando 2 pannelli diversi per i pazienti affetti da carcinoma renale e da melanoma su biopsie ottenute prima e a fine trattamento, all'uscita dal protocollo per conclusione del ciclo di terapia o progressione. In particolare, per i pazienti con RCC è stata valutata l'espressione degli antigeni MAGE3A, survivina, NY-ESO, G250/CA-IX, EGFR, mentre per i pazienti con melanoma era prevista l'analisi dell'espressione di MAGE3A, survivina, NY-ESO, MELAN-A/Mart, gp100 e tirosinasi. Si è osservata elevata espressione di antigeni tumorali specifici per il melanoma sia in biopsie pre terapia che post terapia. Non si sono osservate particolari variazioni di espressione di tali antigeni dopo il trattamento seppur è interessante notare la diminuzione di MAGEA3, da considerare come fattore prognostico positivo così come il calo di EGFR. La variazione di TAA rilevata in immunohistochimica non pare comunque essere indicativa.

Figura 6: valutazione immunohistochimica su sezioni pre e post trattamento

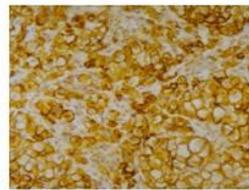
Antigeni tumorali								
Melanoma			Melanoma/Ca. Renale			Ca. renale		
MART-1 Mediana% (range)	gp100 Mediana% (range)	Tyrosinasi Mediana% (range)	MAGEA3 Mediana% (range)	Survivina Mediana% (range)	NY-ESO Mediana% (range)	CAIX Mediana% (range)	EGFR Mediana% (range)	
PRE	85 (60-100)	40 (5-60)	90 (70-100)	100 (60-100)	0 (0-5)	0	100 (80-100)	75 (0-100)
POST	80 (40-100)	40 (10-100)	87 (40-100)	85 (20-100)	0 (0-5)	0	100	50 (10-100)



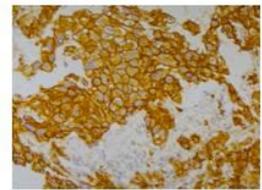
MART-1



MAGEA3



CAIX



EGFR

Tutti i dati raccolti sono stati interamente analizzati, al fine di valutare una correlazione statistica tra i diversi parametri. Nella prima analisi, vengono riportati i valori predittivi di ogni singolo marcatore rilevato al baseline su scala continua. Si indica con *odd ratio* (OR) il rischio di avere una risposta *Disease Control* (DC), ovvero prognostica positiva. Se per esempio per i linfociti si ha un OR = 1.149, significa che all'aumentare di un'unità del valore dei linfociti, il rischio di avere il DC aumenta del 14.9%. Attraverso questa analisi è possibile osservare che il valore dell'IL-12 è significativo; i dati sono riassunti in figura 8 e in grassetto sono evidenziati i valori significativi.

Figura 7: Univariate logistic regression analysis of response (variabili continue rilevate al baseline)

	OR (95% CI)	p
linfo	1.149 (0.100-13.198)	0.911
nlr	0.974 (0.403-2.354)	0.954
tregact	1.000 (1.000-1.000)	0.980
th1act	1.001 (0.999-1.002)	0.284
th17act	1.000 (1.000-1.001)	0.296
tregnat	1.000 (1.000-1.000)	0.703
th1nat	1.000 (1.000-1.001)	0.396
th17nat	1.000 (1.000-1.001)	0.160
cd3cd4eff	1.000 (1.000-1.001)	0.297
cd3cd4naive	1.000 (1.000-1.000)	0.538
cd3cd4effmem	1.000 (1.000-1.001)	0.195
cd3cd4cenmem	1.000 (1.000-1.000)	0.442
cd3cd8eff	1.000 (1.000-1.000)	0.431
cd3cd8naive	1.000 (1.000-1.000)	0.530
cd3cd8effmem	1.000 (1.000-1.000)	0.494
cd3cd8cenmem	1.000 (1.000-1.000)	0.855
pbmctyr	1.023 (0.837-1.250)	0.824
pbmcbgp	1.036 (0.949-1.131)	0.430
pbmcm	1.031 (0.948-1.120)	0.478
pbmcsurv	1.032 (0.862-1.235)	0.733
pbmcnyses	1.086 (0.917-1.287)	0.338
pbmcmagea	1.073 (0.951-1.209)	0.253
vegf	1.006 (0.996-1.015)	0.227
fibronec	1.311 (ns)	0.978
hil1b	3.330 (0.041-273.160)	0.593
hil6	ns	0.332
hil8	0.983 (0.918-1.052)	0.611
hil10	0.383 (0.075-1.953)	0.248
hil12	0.290 (0.083-1.015)	0.053
htnfa	1.483 (0.757-2.908)	0.251

E' stata inoltre condotta l'analisi della varianza (ANOVA) sui i pazienti che avevano tre "punti comuni" siglati come C1, C2 e C3; i punti comuni corrispondono allo stesso step di prelievo, quindi con medesima cadenza temporale per la raccolta dei campioni biologici rispetto la schedula di trattamento. Il *p value* relativo all'analisi della varianza per misure ripetute è significativo se diverso nelle 3 medie nei 3 tempi. E' necessario considerare con cautela questo valore, seppur significativo poiché i test eseguiti sono molti, inoltre queste analisi sono effettuate quando sono contemporaneamente presenti i valori dei marcatori ai 3 tempi e il numero dei pazienti si riduce notevolmente. In figura 8 vengono riportati i parametri estrapolati dalle diverse valutazioni. In grassetto vengono evidenziati i parametri predittivi.

Figura 8 Analysis of variance (ANOVA) for repeated measures (n=5)

	Time "C1"	Time "C2"	Time "end"	
	Mean value (SE)	Mean value (SE)	Mean value (SE)	p
linfo	1.70 (0.27)	2.12 (0.39)	2.82 (0.66)	0.046
nlr	2.91 (0.43)	1.89 (0.40)	2.30 (0.70)	0.174
tregact	3169.37 (937.77)	4395.00 (716.16)	7608.00 (1280.89)	0.049
th1act	1452.18 (707.44)	1841.68 (464.95)	3902.57 (1344.61)	0.126
th17act	2474.88 (510.36)	2163.75 (473.66)	5015.47 (1123.48)	0.035
tregnat	14648 (3650.27)	21545 (4756.71)	31238 (3824.55)	0.013
th1nat	2381.01 (1043.72)	3186.17 (789.81)	4459.12 (1400.52)	0.243
th17nat	5080.24 (979.35)	4094.78 (444.57)	7755.84 (1106.06)	0.022
cd3cd4eff	2894 (1367.60)	3390 (1872.06)	4894 (2801.59)	0.471
cd3cd4naive	235732 (34677.93)	209374 (18239.58)	333506 (128512.08)	0.399
cd3cd4effmem	6020 (1949.17)	12076 (4089.12)	24790 (12583.97)	0.168
cd3cd4cenmem	469278 (92075.64)	725566 (244835.88)	696422 (194245.87)	0.178
cd3cd8eff	6530 (3616.84)	7324 (3214.49)	8616 (4561.64)	0.560
cd3cd8naive	278134 (67344.70)	320164 (94525.51)	341496 (84519.80)	0.433
cd3cd8effmem	7302 (5204.94)	11818 (7988.80)	13124 (8352.26)	0.135
cd3cd8cenmem	127466 (40337.75)	177290 (59539.11)	194722 (73020.12)	0.104
pbmctyr	3.44 (1.61)	2.50 (1.51)	4.25 (1.81)	0.627
pbmcgp	27.56 (11.09)	29.31 (19.36)	32.19 (16.96)	0.960
pbmcm	15.00 (6.66)	15.44 (8.24)	24.81 (21.44)	0.845
pbmcsurv	3.94 (0.98)	3.00 (1.92)	2.87 (0.93)	0.799
pbmcnyeso	11.00 (3.72)	6.25 (3.47)	13.50 (5.02)	0.213
pbmcmagea	19.50 (8.97)	0.14 (0.06)	14.00 (8.47)	0.110
vegf	591.36 (147.64)	549.09 (92.72)	660.36 (105.43)	0.685
fibronec	0.29 (0.02)	0.22 (0.03)	0.21 (0.03)	0.074
hil1b	0.31 (0.29)	0.28 (0.22)	0.16 (0.05)	0.729
hil6	7.68 (1.05)	6.08 (1.48)	6.51 (1.76)	0.777
hil8	4.48 (0.69)	4.12 (1.01)	4.77 (1.87)	0.938
hil10	1.49 (0.42)	2.18 (0.92)	5.54 (0.94)	0.012
hil12	0.75 (0.41)	0.62 (0.29)	0.48 (0.18)	0.431
htnfa	2.66 (1.05)	2.66 (1.05)	1.52 (0.79)	0.138

SE=Standard Error

9. CONCLUSIONI

La piccola casistica su cui sono state condotte queste indagini, suggerisce di aumentare il numero di pazienti su cui effettuare le determinazioni al fine di ottenere dei dati più consistenti. Quello che però traspare è che l'interleuchina 2 ad alte dosi è da considerarsi ad oggi ancora una valida opzione terapeutica, che la tossicità farmaco correlata è comunque clinicamente accettabile. La valutazione e individuazione di biomarcatori i predittivi di risposta ha dimostrato che i dati più interessanti sono quelli emersi con il metodo ELISPOT poiché pare che la progressione di malattia coincida con una diminuzione di risposte verso gli antigeni tumori associati; questo potrebbe suggerire un monitoraggio più serrato dei pazienti in trattamento con alte dosi di IL-2 al fine di individuare tempestivamente significative variazioni nella risposta ai TAA, predittive di progressione di malattia. L'aumento statisticamente significativo dell'IL-12 indica che il trattamento genera una risposta immune generalizzata. Questi dati preliminari hanno permesso inoltre di constatare che il trattamento funziona maggiormente nei casi di RCC e tale osservazione ha fatto sì che il protocollo clinico fosse emendato per proseguire con l'arruolamento dei soli pazienti affetti da carcinoma renale a cellule chiare. In considerazione dei risultati clinici incoraggianti soprattutto per il carcinoma renale, della attività immunologica osservata e dei pochi pazienti che mancano per terminare lo studio, il protocollo rimarrà aperto e proseguirà con l'arruolamento.

10. BIBLIOGRAFIA

1. Rosenberg SA, Yang JC, White DE, et al. Durability of complete responses in patients with metastatic cancer treated with high-dose interleukin-2: identification of the antigens mediating response. *Ann Surg.* 1998;228:307-319
2. Dutcher JP. High-dose interleukin-2 therapy for metastatic renal cell carcinoma and metastatic melanoma: still the standard. *Oncology (Williston Park)* 2011;25:427-428
3. Schwartzentruber DJ. Guidelines for the safe administration of high-dose interleukin-2. *J Immunother.* 2001;24:287-293
4. Quan W, Jr, Brick W, Vinogradov M, et al. Repeated cycles with 72-hour continuous infusion interleukin-2 in kidney cancer and melanoma. *Cancer Biother Radiopharm.* 2004;19:350-354
5. Demaria S, Bhardwaj N, McBride WH, et al. Combining radiotherapy and immunotherapy: a revived partnership. *Int J Radiat Oncol Biol Phys.* 2005;63:655-666
6. Demaria S, Formenti SC. Radiotherapy effects on anti-tumor immunity: implications for cancer treatment. *Front Oncol.* 2013;3:128.
7. Formenti SC, Demaria S. Radiation therapy to convert the tumor into an in situ vaccine. *Int J Radiat Oncol Biol Phys.* 2012;84:879-880
8. Demaria S, Formenti SC. Sensors of ionizing radiation effects on the immunological microenvironment of cancer. *Int J Radiat Biol.* 2007;83:819-825
9. McDermott DF, Cheng SC, Signoretti S, et al. The high-dose aldesleukin "select" trial: a trial to prospectively validate predictive models of response to treatment in patients with metastatic renal cell carcinoma. *Clin Cancer Res* 2015;21:561-568.
10. McDermott D, Lebbe C, Hodi FS, et al. Durable benefit and the potential for long-term survival with immunotherapy in advanced melanoma. *Cancer Treat Rev.* 2014;40:1056-1064

11. Hamid O, Schmidt H, Nissan A, et al. A prospective phase II trial exploring the association between tumor microenvironment biomarkers and clinical activity of ipilimumab in advanced melanoma. *J Transl Med.* 2011;9:204
12. Ascierto PA, Capone M, Urba WJ, et al. The additional facet of immunoscore: immunoprofiling as a possible predictive tool for cancer treatment. *J Transl Med.* 2013;11:54
13. Wood KJ, Sakaguchi S. Regulatory T cells in transplantation tolerance. *Nat Rev Immunol.* 2003 Mar;3(3):199-210. Review
14. Terabe M. et al. Immunoregulatory T cells in tumor immunity. *Curr Opin Immunol,* 2004
15. Lopez M et al. The role of regulatory T lymphocytes in the induced immune response mediated by biological vaccines. *Immunobiology* 2006
16. Khazaie K, von Boehmer H. The impact of CD4(+)CD25(+) Treg on tumor specific CD8(+) T cell cytotoxicity and cancer. *Semin Cancer Biol.* 2006
17. Smyth MJ et al. CD4+CD25+ T Regulatory Cells Suppress NK Cell-Mediated Immunotherapy of Cancer. *J Immunol.* 2006
18. Ahmadzadeh M, Rosenberg SA. IL-2 administration increases CD4+CD25(hi) Foxp3+regulatory T cells in cancer patients. *Blood,* 2006
19. Wolf AM. et al. Increase of regulatory T cells in peripheral blood of cancer patients. *Clin Cancer Res,* 2003
20. Woo EY. et al. Regulatory CD4+CD25+ T cells in tumors from patients with early-stage non small cell lung cancer and late-stage ovarian cancer. *Cancer Res,* 2001
21. Yamazaki S. et al. Direct expansion of functional CD25⁺CD4⁺ regulatory T cells by antigen-processing dendritic cells. *J Exp Med,* 2005
22. Liyanage UK. et al. Prevalence of regulatory T cells is increased in peripheral blood and tumor microenvironment of patients with pancreas or breast adenocarcinoma. *J Immunol,* 2002
23. Javala LR and Rosenberg SA. CD4⁺CD25⁺ suppressor lymphocytes in the circulation of patients immunized against melanoma antigens. *J Immunother,* 2003

24. Sasada T. et al. CD4⁺CD25⁺regulatory T cells in patients with gastrointestinal malignancies. *Cancer*, 2003
25. Viguier M. et al. Foxp3 expressing CD4⁺CD25 high regulatory T cells are overrepresented in human metastatic melanoma lymphnodes and inhibit the function of infiltrating T cells. *J Immunol*, 2004
26. Dannull J et al. Enhancement of vaccine-mediated antitumor immunity in cancer patients after depletion of regulatory T cells. *J ClinInvest*. 2005
27. Zhang H et al. Lymphopenia and interleukin-2 therapy alter homeostasis of CD4⁺CD25⁺ regulatory T cells. *Nat Med*. 2005
28. Drake CG, Jaffee E, Pardoll DM. Mechanisms of immune evasion by tumors. *Adv Immunol* 2006 90: 51-81
29. Topalian SL, Rosenberg SA. Tumor specific cytolysis by lymphocytes infiltrating human melanomas. *J Immunol* 1989 142: 3714-25
30. Geertsen R, Hofbauer G, Kamarashev J, Yue FY, Dummer R. Immune escape mechanisms in malignant melanoma. *Int J Mol Med* 1999 3:49-57
31. Marincola FM, Jaffee EM, Hicklin JD, Ferrone S. Escape of human solid tumors from T-cell recognition: molecular mechanisms and functional significance. *Adv Immunol* 2000 174: 181-273
32. Albertsson PA, Basse PH, Hokland M, Goldfarb RH, Nagelkerke JF, Nannmark U, Kuppen PJ. NK cells and the tumour microenvironment: implications for NK-cell function and anti-tumour activity. *Trends Immunol*. 2003 Nov;24(11):603-9
33. Gabrilovich D. J., Chen H. L., Girgis K. R., Cunningham H. T., Meny G. M., Nadaf S., Kavanaugh D., Carosso D. P. Production of vascular endothelial growth factor by human tumors inhibits the functional maturation of dendritic cells. *Nature Medicine* 1996 2 (10): 1096-1103
34. Mocellin S, Wang E, Marincola FM. Cytokines and immune response in the tumor microenvironment. *J Immunother* 2001 24: 392-407
35. Zou W. Immunosuppressive networks in the tumour environment and their therapeutic relevance. *Nat Rev Cancer* 2005 5: 263-74

36. Muller AJ, Melachowski WP, Prendergast GC. Indoleamine 2,3-dioxygenase in cancer: targeting pathological immune tolerance with smallmolecule inhibitors. *Expert Opin Ther Targets* 2005 9: 831-49
37. Andreola G, Rivoltini L, Castelli C, Huber V, Perego P, Deho P, Squarcina P, Accornero P, Lozupone F, Lugini L, Stringaro A, Molinari A, Arancia G, Gentile M, Parmiani G, Fais S. Induction of lymphocyte apoptosis by tumor cell secretion of FasL-bearing microvesicles. *Exp Med* 2001 195: 1303-16
38. Whiteside TL, Rabinowich H. The role of Fas/FasL in immunosuppression induced by human tumors. *Cancer Immunol Immunother* 1998 46: 175-84
39. Bron LP, Scolyer RA, Thompson JF, Hersey P. Histological expression of tumour necrosis factor-related apoptosis-inducing ligando (TRAIL) in human primary melanoma. *Pathology* 2004 36:561-5
40. Koyama S, Koike N, Adachi S. Expression of TNF-related apoptosisinducing ligando (TRAIL) and its receptors in gastric carcinoma and tumor-infiltrating lymphocytes: a possible mechanism of immune evasion of the tumor. *J Cancer Res Clin Oncol* 2002 128: 73-9
41. Martinez-Lorenzo MJ, Anel A, Alava MA, Pineiro A, Naval J, Lasierra P, Larrad L. The human melanoma cell line MelJuSo secretes bioactive FasL and APO2L/TRAIL on the surface of microvesicles. Possible contribution to tumor counterattack. *Exp Cell Res* 2004 295:315-29
42. Nakabayashi H, Nakashima M, Hara M, Toyonaga S, Yamada SM, Park KC, Shimizu K. Clinico-pathological significance of RCAS1 expression in gliomas: a potential mechanism of tumor immune escape. *Cancer Lett* 2007 246: 182-922
43. Fukuda S, Pelus LM. Survivin, a cancer target with an emerging role in normal adult tissues. *Mol Cancer Ther* 2006 5: 1087-98
44. Gorczynski RM. CD200 and its receptors as targets for immunoregulation. *Curr Opin Investig Drugs* 2006 6: 483-8
45. Igney FH, Krammer PH. Tumor counterattack: fact or fiction? *Cancer Immunol Immunother* 2005 54: 1127-36

11. ELENCO ATTIVITA' FORMATIVE

PUBBLICAZIONE ARTICOLI

1. de Rosa F, Ridolfi L, Ridolfi R, Gentili G, Valmorri L, Nanni O, Petrini M, Fiammenghi L, Granato AM, Ancarani V, Pancisi E, Soldati V, Cassan S, Riccobon A, Parisi E, Romeo A, Turci L, Guidoboni M.

“Vaccination with autologous dendritic cells loaded with autologous tumor lysate or homogenate combined with immunomodulating radiotherapy and/or preleukapheresis IFN- α in patients with metastatic melanoma: a randomised "proof-of-principle" phase II study”.

J Transl Med. 2014 Jul 22;12:209. doi: 10.1186/1479-5876-12-209

2. de Rosa F, Ridolfi L, Fiammenghi L, Petrini M, Granato AM, Ancarani V, Pancisi E, Soldati V, Cassan S, Bulgarelli J, Framarini M, Tauceri F, Migliori G, Brolli C, Gentili G, Petracci E, Nanni O, Riccobon A, Ridolfi R, Guidoboni M.

“Dendritic cell vaccination for metastatic melanoma: a 14-year monoinstitutional experience”

Melanoma Res.2017Aug;27(4):351-357.doi: 10.1097/CMR.0000000000000356

PARTECIPAZIONI A CORSI E ATTIVITA' DI FORMAZIONE:

1. Professioni sanitarie, orari di lavoro e diritti dei lavoratori" edizione 6, Bologna 18 ottobre 2017
2. Corso ECM-FAD 189583 “Comunicare in sanità 2017”, Giugno 2017
3. Analisi delle registrazioni Settore di Produzione e Settore di Controllo Qualità”, Meldola (FC) 8-9 maggio 2017
4. Training in the job: gestione e pratiche GMP, Meldola (FC) 2-3/03/2017
5. Trasmissione e interferenza. Il rischio infettivo in strutture riabilitative di alta specialità, Imola (BO), 02/12/2016
6. Professioni sanitarie e sociosanitarie; norme, contratti, diritti e doveri, Bologna 25/10/2016

7. Novità in ambito normativo sulle Terapie Avanzate, analisi del rischio ed applicazioni in ambito GMP, Meldola (FC) 11-12/10/2016
8. L'immunoterapia dei tumori: tra stato dell'arte e prospettive di pratica clinica, Meldola (FC) 05/07/2016
9. Terapia del dolore in oncologia: interazioni e compatibilità tra farmaci, Meldola (FC) 07/06/2016
10. Corso NIBIT Formazione sulla immunoterapia dei tumori umani Meldola (FC) 26/06/2015
11. Pipeline Bayer Meldola (FC) 09/06/2015
12. Il DEC: Direttore Esecuzione del Contratto Meldola (FC) 25/05/2015
13. Il clearing delle macchine e delle attrezzature. Metodi di analisi, aspetti normativi e casi pratici, Firenze 5 maggio 2016
14. La corretta gestione dei rifiuti compresi quelli radioattivi Meldola (FC) 29/04/2015
15. Relatore presso PEC giornate di microbiologia Firenze 25-26/03/2015
16. Targeted Therapy of Cancer: where we are headin, Torino, 27 giugno 2014
I processi di pulizia, sanitizzazione e decontaminazione, Il mantenimento della classe di pulizia negli ambienti a contaminazione controllata, Milano, 22 maggio 2014

PARTECIPAZIONI A CONGRESSI:

4° Interantional Conference Traslational research in oncology, Meldola e Forlì, 8 – 11 novembre 2016

3° Interantional Conference Traslational research in oncology, Meldola e Forlì, 6 – 9 maggio 2014

RELATORE A CONGRESSI:

Giornate di microbiologia PEC, Firenze 25-26 marzo 2015

POSTER:

de Rosa F, Valentina Ancarani V, Framarini M, Riccobon A, Guidoboni M, Ridolfi L, Pancisi E, Petrini M, Soldati V, Testori A, Fiammenghi L, Cassan S, Migliori G, Granato AM, Gentili G, Ridolfi R.

“Vaccinazione con cellule dendritiche autologhe per melanoma metastatico: valutazioni retrospettive su 82 pazienti in una casistica monocentrica”. IMI Annual Meeting 2014

Bulgarelli J¹, Ancarani V¹, Pancisi E¹, Petrini M¹, Riccobon A¹, Fiammenghi L¹, Cassan S¹, Soldati V¹, Ridolfi L¹, De Rosa F¹, Gentili G², Amadori D³, Ridolfi R¹, Guidoboni M¹, Granato AM¹

“The double face of dendritic cell vaccination in metastatic melanoma: inducing intratumor immune response can switch tumor cells toward dedifferentiated state”

14th CIMT Annual Meeting, 2016