



UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI PADOVA

FACOLTÀ DI MEDICINA E CHIRURGIA
DIPARTIMENTO DI SCIENZE ONCOLOGICHE E
CHIRURGICHE
SEZIONE DI ONCOLOGIA

DOTTORATO DI RICERCA IN
ONCOLOGIA E ONCOLOGIA CHIRURGICA
XX CICLO

APPROCCI DI IMMUNOTERAPIA
ATTIVA E PASSIVA
BASATI SULL'ANTIGENE TELOMERASI
IN MODELLI DI CARCINOGENESI MURINA

COORDINATORE: CHIAR.MO PROF. PAOLA ZANOVELLO

SUPERVISORE: DOTT. VINCENZO BRONTE

DOTTORANDO: DOTT. STEFANO UGEL

31 GENNAIO 2008

*"Coloro che sognano di giorno
sanno molte cose che sfuggono
a chi sogna soltanto di notte."*

Edgar Allan Poe

INDICE

SUMMARY	1
RIASSUNTO	3
INTRODUZIONE.....	5
"Cancer Immunoediting": una nuova visione del rapporto tra sistema immunitario e tumore.....	5
Immunoterapia e tumori.....	15
Immunoterapia attiva: la sfida della vaccinazione a DNA.....	18
Immunoterapia passiva: il successo del trasferimento adottivo degli effettori immunitari CD8 ⁺	25
Telomerasi come antigene tumorale universale, candidato ideale per l'immunoterapia anti-tumorale.	31
Il topo TRAMP: un modello di studio della carcinogenesi prostatica.	33
SCOPO DELLA TESI	41
MATERIALI & METODI.....	45
TOPI.....	45
Screening topi TRAMP.....	45
TERRENI DI COLTURA.....	46
Colture cellulari.....	46
Colture utilizzate per i saggi	47
LINEE CELLULARI.....	47
PEPTIDI.....	48
ALLESTIMENTO DI COLTURE LEUCOCITARIE.....	49
Allestimento di Colture Leucocitarie Miste (MLC).....	49
Allestimento delle colture leucocitarie stimulate da peptide (MLPC).....	49
ANALISI CITOFLUORIMETRICA	50
SAGGI FUNZIONALI	50
Test ELISPOT (Enzyme-Linked Immunonoassobent Spots Assays).....	50
Test E.L.I.S.A. (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay).....	50
Valutazione della risposta citotossica tramite saggio di rilascio di ⁵¹ Cr.....	51
COSTRUTTI PLASMIDICI.....	52
ANALISI SPECTRATYPING E CLONOTIPICA DEL TCR.....	53
VIRUS.....	54
VACCINAZIONE A DNA PLASMIDICO.....	54
VACCINAZIONE TRAMITE VETTORE ADENOVIRALE.....	54
INOCULO DEL TUMORE	54
TRASFERIMENTO ADOTTIVO DI CTL	55
Modello di melanoma metastatico polmonare	55
Modello di tumore sottocutaneo	55
ANALISI ISTOLOGICA E IMMUNOISTOCHIMICA	55
ANALISI STATISTICHE	56
RISULTATI.....	57
Comparazione tra due protocolli di immunizzazione attiva basati su vaccini a DNA codificanti l'antigene telomerasi murina (m-TERT).	57
Valutazione dell'effetto terapeutico del trasferimento adottivo della popolazione policlonale di linfociti T citotossici (CTL) specifici per l'epitopo m-TERT ₁₉₈₋₂₀₅ in animali portatori di tumore.	73
Identificazione e caratterizzazione funzionale di un clone CTL ad alta affinità specifico per l'epitopo m-TERT ₁₉₈₋₂₀₅	81

Valutazione dell'efficacia terapeutica delle due strategie vaccinali a DNA verso l'antigene TERT in un modello murino di carcinogenesi prostatica spontanea.

.....	87
DISCUSSIONE	101
BIBLIOGRAFIA	105
ABBREVIAZIONI.....	115
PUBBLICAZIONI	117
<i>Ringraziamenti</i>	119

SUMMARY

Aim of this work was to verify the therapeutic efficacy of active and passive vaccination against m-TERT in mice bearing transplantable tumors and in an autochthonous mouse model of prostate cancer: the TRAMP model. To choose the best vaccination protocol we developed DNA-based antigen-specific expression systems employing eukaryotic plasmid expression vectors and recombinant adenoviruses. We used splenocytes from vaccinated mice to set up mixed leukocyte peptide cultures (MLPC) with the mouse (m)-TERT₁₉₈₋₂₀₅ peptide. This sequence of mouse TERT was identified as the immunodominant epitope by screening overlapping peptides covering the whole protein. MLPC were tested in IFN γ -specific E.L.I.S.A. assay against peptide-pulsed cells and unpulsed tumor cell lines of different histotypes, but with the same H-2^b haplotype. A persistently high level of recognition was noted against peptide-pulsed cell lines, whereas repeated *in vitro* stimulation with γ -irradiated syngeneic splenocytes pulsed with a low dose of m-TERT₁₉₈₋₂₀₅ peptide (0.1 μ M) every week led to an increased recognition of unpulsed tumor cell lines. This enhanced recognition was observed only in MLPC from mice vaccinated with DNA plasmid vector and suggested a preferential proliferation of high-avidity CTL clones under these culture conditions. The augment in high-avidity CTLs is supported by TCR analysis by spectratyping, that proved a positive selection of V β -11 chain of TCR during *in vitro* passages together with TCR clonotype enrichment. We demonstrated an important therapeutic effect by m-TERT₁₉₈₋₂₀₅ polyclonal CTLs transfer in a metastatic melanoma model, where mice treated with CTLs transfer presented a significant reduction of the lung metastases compared with untreated controls, and in transplantable tumor models, where TERT₁₉₈₋₂₀₅ CTLs induced a statistically significant delay in tumor growth and a survival increase in both melanoma- and prostate carcinoma-bearing mice.

To identify and isolate high affinity CTL clones specific for m-TERT₁₉₈₋₂₀₅ epitope we used the limiting dilution technique starting from the polyclonal CTLs. We obtained a large spectrum of clones, among which clone CTL-7 was the most intriguing. In fact it was able to recognize tumor cell lines of different histotypes (melanoma, prostate carcinoma, colon carcinoma and sarcoma) as well as peptide-pulsed cell lines. Transfer of CTL-7 clone exerted a better therapeutic effect on lung metastases generated by melanoma cells.

We also investigated the possibility to elicit a protective antitumor response through an active immunization in TRAMP mice. We performed a cycle of two biweekly i.m. injections of a plasmid encoding m-TERT repeated every 10 weeks for the entire life of the mouse. Mice vaccinated against m-TERT showed a reduction of tumor progression at week 24th and a survival prolongation compared to mock vector-treated groups.

These data represent a good platform to translate more effective vaccines for the therapy of human cancers.

RIASSUNTO

Lo scopo di questo lavoro è stato verificare l'efficacia terapeutica di interventi di vaccinazione attiva e passiva antitumorale, sfruttando l'antigene m-TERT, sia in modelli di crescita tumorale indotta dall'inoculo di cellule tumorigeniche sia in un modello murino transgenico di carcinogenesi prostatica spontanea: il modello murino TRAMP. Abbiamo confrontato due modalità di vaccinazione basate sull'impiego di vettori plasmidici o adenovirali codificanti l'antigene di interesse, con lo scopo di scegliere la più efficace. Abbiamo utilizzato gli splenociti derivanti dagli animali vaccinati per allestire colture leucocitarie stimulate con il peptide (MLPC) utilizzando il peptide m-TERT₁₉₈₋₂₀₅. Questo peptide è stato identificato come epitopo immunodominante della ribonucleoproteina telomerasi murina tramite screening di un pannello completo di peptidi che coprivano l'intera sequenza della proteina. Le MLPC sono state testate funzionalmente in saggi E.L.I.S.A. per rilascio di IFN- γ dopo cocoltura con bersagli cellulari pulsati con il peptide m-TERT₁₉₈₋₂₀₅ o con cellule tumorali di diversa istologia ma di medesimo aplotipo H-2^b. Abbiamo dimostrato un riconoscimento persistente delle cellule pulsate con il peptide m-TERT₁₉₈₋₂₀₅ da parte sia delle MLPC derivate dagli animali vaccinati con solo DNA plasmidico che da quelle derivate dagli animali vaccinati con il regime a "prime-boost". Solo dopo ripetuti passaggi *in vitro*, durante i quali le MLPC venivano ristimate utilizzando splenociti singenici γ -irradiati e pulsati con dosi basse di peptide m-TERT₁₉₈₋₂₀₅ (0.1 μ M), abbiamo notato un incremento nel riconoscimento di bersagli cellulari non pulsati da parte unicamente delle MLPC derivate dagli animali vaccinati con DNA plasmidico, suggerendoci la possibilità di aver indotto la proliferazione di linfociti a maggior affinità per l'antigene. L'aumento di linfociti T citotossici (CTL) a maggior affinità è stata dimostrata tramite l'analisi spectratyping del TCR, che ha rilevato una selezione positiva della catena V β -11 durante i passaggi *in vitro*. Abbiamo quindi dimostrato un importante effetto terapeutico indotto dal trasferimento dei CTL policlonali m-TERT specifici sia in un modello di melanoma metastatico a livello polmonare in cui gli animali trattati tramite trasferimento dei CTL m-TERT specifici hanno presentato una riduzione significativa delle metastasi, sia in due modelli tumorali trapiantabili di diversa istologia in cui il trattamento ha indotto un significativo aumento della sopravvivenza. Successivamente tramite la tecnica "limiting dilution" abbiamo ottenuto un ampio spettro di cloni CTL m-

TERT specifici, dei quali il clone CTL-7 è risultato il più interessante. Infatti il clone CTL-7 *in vitro* è stato capace di riconoscere cellule tumorali di differente istologia (melanoma, carcinoma prostatico, carcinoma del colon e sarcoma) allo stesso modo delle cellule pulstate con il peptide sia in saggi E.L.I.S.A. per rilascio di IFN- γ sia in saggi di citotossicità. Inoltre il clone CTL-7 ha evidenziato un miglior effetto terapeutico *in vivo* rispetto alla coltura policlonale, infatti gli animali trattati tramite trasferimento del clone CTL-7 erano efficientemente curati dalle metastasi polmonari indotte dalle cellule di melanoma.

Abbiamo inoltre studiato la possibilità di impiegare la vaccinazione attiva per indurre una risposta protettiva antitumorale nel modello TRAMP. Pertanto è stato sviluppato un protocollo di vaccinazione basato su un doppio inoculo intramuscolo (i.m.) di DNA plasmidico ad intervalli di 15 giorni e successivi richiami ogni 10 settimane per tutta la vita dell'animale. Gli animali vaccinati contro m-TERT hanno evidenziato, tramite analisi istologica, una riduzione nella progressione del tumore già alla ventiquattresima settimana e un aumento della sopravvivenza di circa 11 settimane rispetto agli animali vaccinati con il plasmide vuoto.

Questi dati rappresentano, quindi, un buon trampolino di lancio per traslare l'utilizzo di vaccini nella terapia anti-tumorale nell'uomo.

INTRODUZIONE

"Cancer Immunoediting": una nuova visione del rapporto tra sistema immunitario e tumore

Nel 1909 Paul Erlich per primo ipotizzò che il sistema immunitario proteggesse l'organismo dallo sviluppo di tumori, che altrimenti sarebbero stati molto più frequenti. Le prove dell'esistenza di una relazione tra sistema immunitario e crescita tumorale si ebbero inizialmente, nella metà del ventesimo secolo, in seguito agli studi sul rigetto allo-genico che chiarirono il ruolo del sistema immunitario nel riconoscimento e nell'eliminazione di tumori trapiantabili tra ceppi murini outbred. Questi lavori gettarono le basi per la definizione degli alloantigeni ma, allo stesso tempo, misero in dubbio l'esistenza di un meccanismo di rigetto tumore-specifico per le neoplasie. L'impiego di ceppi inbred permise in seguito di dimostrare come si potessero immunizzare topi contro trapianti singenici di tumori indotti da agenti chimici e virus, comprovando la presenza di antigeni tumore-specifici (Old and Boyse 1964; Klein 1966).

I continui progressi in immunobiologia e immunogenetica, ed in particolare le prove iniziali dell'esistenza di antigeni associati al tumore (TAA), permisero quindi a Burnet e Thomas di formulare la cosiddetta "ipotesi dell'immunosorveglianza". Secondo questa teoria il sistema immunitario sarebbe stato in grado di sorvegliare costantemente i tessuti dell'ospite dall'emergere di cellule trasformate. I neo-antigeni specifici delle cellule tumorali avrebbero provocato una reazione immunologica capace di eliminare la neoplasia emergente, una necessità evolutiva per la sopravvivenza, come la protezione contro le infezioni (Burnet 1964; Burnet 1970). Secondo Thomas, inoltre, gli organismi più evoluti avrebbero dovuto possedere dei meccanismi di protezione verso i tumori, simili a quelli che mediano il rigetto allogenico, mantenendo in questo modo l'omeostasi tissutale negli organismi multicellulari complessi.

Una serie di esperimenti vennero condotti negli anni seguenti per confermare questa ipotesi. Inizialmente vennero utilizzati diversi modelli sperimentali di immunosoppressione indotta, tra cui la timectomia neonatale (Grant and Miller 1965; Vandeputte and De Somer 1965; Burstein and Law 1971), l'impiego di siero anti-linfocitario eterologo e metodi farmacologici (Stutman 1975), allo scopo di indagare se lo sviluppo tumorale potesse essere influenzato dalla

soppressione del sistema immune dell'ospite. Si ottennero risultati discordanti che dimostrarono solo come gli animali immunocompromessi avessero una maggior suscettibilità verso gli agenti infettivi e, di conseguenza, verso tumori di origine virale e verso le neoplasie linfoproliferative causate da una stimolazione linfocitaria cronica, ma non verso tumori spontanei o indotti da agenti chimici. Anche la sperimentazione su topi nudi atimici, portatori di un'alterazione immunologica a base genetica, sembrò escludere che tali animali fossero più suscettibili rispetto ai controlli allo sviluppo di tumori spontanei o chimicamente indotti (Stutman 1974; Stutman 1979).

I risultati così ottenuti, con l'uso di modelli di immunodeficienza imperfetti, in cui si ignorava l'azione di altri effettori del sistema immunitario, quali, ad esempio, le cellule natural killer (NK) timo-indipendenti (allora sconosciute) e le cellule T $\gamma\delta$, che in parte possono svilupparsi al di fuori del timo, non provavano l'esistenza dell'immunosorveglianza e questo portò ad abbandonare prematuramente tale teoria verso la fine degli anni Settanta.

Successivamente vennero effettuati studi di tumorigenesi in topi SCID (severe-combined immunodeficiency), che mancano di una subunità funzionalmente attiva di una protein chinasi DNA-dipendente (DNA-PK) necessaria al corretto riarrangiamento dei recettori linfocitari per l'antigene. Questi topi sono perciò incapaci di sviluppare risposte immunitarie antigene-specifiche ed, in effetti, essi mostravano maggiore suscettibilità ai tumori indotti. Tuttavia, va tenuto presente che DNA-PK è un enzima espresso in tutte le cellule dell'organismo ed è coinvolto nella riparazione di danni al DNA, per cui una sua deficienza potrebbe di per sé favorire lo sviluppo neoplastico. I dati ottenuti, quindi, non permisero di concludere in maniera definitiva che l'aumentata incidenza tumorale in questi animali fosse dovuta all'immunodepressione (Schuler, Weiler et al. 1986; Engel, Svane et al. 1997).

Tra il 1994 e il 1998 una serie di scoperte rinnovarono l'interesse verso l'ipotesi dell'immunosorveglianza. In primo luogo, studi sullo sviluppo tumorale in modelli murini deficienti per la trasduzione del segnale della citochina interferone (IFN)- γ (Dighe, Richards et al. 1994), insieme all'uso di anticorpi monoclonali neutralizzanti l'azione della stessa citochina (Kaplan, Shankaran et al. 1998), hanno permesso di evidenziare un ruolo protettivo dell'IFN- γ , endogenamente prodotto, nella formazione di neoplasie trapiantate, spontanee o chimicamente

indotte. Questa citochina sembra agire sia a livello del sistema immunitario, promuovendone le funzioni effettrici antitumorali mediante la generazione di linfociti T helper (Th)1 CD4⁺ e citotossici (CTL) CD8⁺ tumore-specifici e l'attivazione dei macrofagi, sia a livello delle cellule tumorali, aumentandone l'immunogenicità attraverso l'induzione di molecole del complesso maggiore di istocompatibilità di classe I (MHC I) coinvolte nella presentazione antigenica (Bach, Aguet et al. 1997).

Inoltre, esperimenti su topi con delezione genetica della perforina (perforina^{-/-}), risultavano maggiormente sensibili all'induzione di tumori con metilcolantrene (MCA), se comparati con la controparte normale o "wild-type". La perforina è una molecola rilasciata dai granuli dei CTL e cellule NK, importante per l'uccisione delle cellule bersaglio anche di origine tumorale. Questi studi hanno sottolineato, quindi, l'importanza dell'attività citolitica di diverse componenti del sistema immune nel controllo dello sviluppo tumorale (Street, Cretney et al. 2001; Takeda, Smyth et al. 2002).

La conferma principale a supporto dell'esistenza del processo di immunosorveglianza nel cancro, dipendente dai linfociti, è venuta dall'uso di topi deficienti RAG-1^{-/-} e RAG-2^{-/-}, i geni che codificano per gli enzimi coinvolti nella ricombinazione del recettore dei linfociti T (TCR) e B (BCR) e nella riparazione di danni al DNA, espressi esclusivamente nel comparto linfoide (a differenza della DNA-PK dei topi SCID presente ubiquitariamente). L'assenza di linfociti B, T e cellule NKT rende questi animali più suscettibili dei controlli all'insorgenza di tumori spontanei e/o indotti (Shankaran, Ikeda et al. 2001).

Da quel momento, la disponibilità di ceppi murini inbred con delezioni mirate a componenti critiche del sistema immunitario ha permesso di confermare l'importanza sia del comparto innato che di quello adattativo nel controllo della trasformazione neoplastica, in particolare di cellule NKT, dei linfociti T con TCR $\gamma\delta$ e $\alpha\beta$, delle cellule NK e di citochine come IFN- γ e interleuchina 12 (IL-12), che hanno funzioni almeno parzialmente sovrapponibili. L'immunosorveglianza si configura, quindi, come un processo eterogeneo che richiede l'azione di diversi effettori immuni, in maniera dipendente dal tipo cellulare tumorale di origine, dal meccanismo di trasformazione, dalla localizzazione anatomica del tumore e dal riconoscimento immunologico prevalente (Dunn, Bruce et al. 2002).

L'ipotesi dell'esistenza del processo di immunosorveglianza, studiata in modelli murini, trova conferme anche per l'uomo. Studi di follow-up su pazienti trapiantati sottoposti a trattamenti immunosoppressivi o affetti da immunodeficienze primarie, indicano che questi individui hanno un maggiore rischio relativo di sviluppare tumore rispetto ad individui immunocompetenti. Questo rischio aumentato deriva, in parte, dalla scarsa protezione verso gli agenti infettivi, che comporta una maggior incidenza di tumori indotti da virus; tuttavia, anche un ampio spettro di sottotipi tumorali, di eziologia non virale, viene riscontrato con maggiore frequenza in questi pazienti (Bui and Schreiber 2007). Dopo il trapianto d'organo, per esempio, è stato riportato un incremento di quattro volte l'incidenza di melanomi spontanei (Sheil 1986).

Ad ulteriore supporto di questi dati epidemiologici, si sono oggi accumulate evidenze sostanziali sulla correlazione positiva tra presenza di linfociti infiltranti il tumore (TIL) e sopravvivenza del paziente, in neoplasie di diversa origine (Lipponen, Eskelinen et al. 1992; Mihm, Clemente et al. 1996; Naito, Saito et al. 1998; Dunn, Bruce et al. 2002).

Studi recenti dimostrano come il concetto dell'immunosorveglianza, inteso inizialmente come un processo di protezione dell'ospite, agente solo nelle fasi precoci della comparsa del tumore, sia in realtà riduttivo. Il sistema immunitario sembra, infatti, avere un ruolo più complesso, sia di contrasto dello sviluppo tumorale che di rimodellamento della neoplasia nel corso della sua progressione, selezionando le varianti tumorali più adatte a sopravvivere in un ambiente immunologicamente intatto, in maniera simile a quanto avviene con virus, batteri e parassiti. Il passaggio ripetuto di tumori trapiantabili in ospiti immunocompetenti generava varianti tumorali con ridotta immunogenicità (Uyttenhove, Pilotte et al. 2003). Esperimenti con tumori trapiantabili in topi parentali ("wild-type") o RAG-2^{-/-}, hanno successivamente mostrato che i tumori sviluppatosi in assenza di un sistema immunitario intatto sono più immunogenici di tumori cresciuti in ospiti immunocompetenti (Shankaran, Ikeda et al. 2001). Linfomi derivati da topi perforina^{-/-} crescevano rapidamente se trapiantati su altri topi perforina^{-/-}, ma venivano invece rigettati se trapiantati su topi wild-type (Street, Cretney et al. 2001). L'ambiente immunologico, quindi, seleziona varianti tumorali che hanno maggiori possibilità di sopravvivere in un ospite immunocompetente, per la ridotta immunogenicità o perchè hanno acquisito

meccanismi di evasione o soppressione del sistema immunitario. Questo processo è favorito dall'instabilità genetica intrinseca delle cellule tumorali e la selezione interessa soprattutto i geni codificanti per antigeni tumorali, per componenti del complesso maggiore di istocompatibilità o per componenti della via di segnalazione del recettore per l'IFN- γ (Dunn, Koebel et al. 2006).

Verosimilmente il rimodellamento immunologico del tumore avviene continuamente, anche se gli effetti maggiori di quest'azione si hanno nelle fasi precoci di crescita, quando il tumore è istologicamente, ma non clinicamente rilevabile. L'immunogenicità dei tumori che vengono diagnosticati, quindi, risulta già modificata dall'interazione con il sistema immunitario, il quale non solo protegge l'individuo dallo sviluppo dei tumori, ma agisce anche sottoponendo il tumore ad una pressione selettiva che ne altera le caratteristiche primarie, talvolta generando tumori più aggressivi. Allo scopo di descrivere tale comportamento è stata, perciò proposta la nuova definizione di "*Cancer Immunoediting*", che comprende tre fasi principali: *eliminazione*, che può dare completa distruzione del tumore e risoluzione del processo senza avanzamento verso le fasi successive; *equilibrio*, in cui cellule tumorali geneticamente instabili sopravvissute sono sottoposte ad un prolungato processo di selezione da linfociti ed IFN- γ per una maggiore resistenza all'attacco immune; "*escape*", in cui le varianti che hanno acquisito insensibilità all'eliminazione iniziano ad espandersi in modo incontrollato, originando tumori clinicamente osservabili. Il grado di rimodellamento del tumore probabilmente dipende dal tipo di cellule operative durante la fase di equilibrio, suggerendo che gli eventi possono essere differenti per ogni tessuto di origine (Dunn, Bruce et al. 2002; Dunn, Old et al. 2004) (Figura 1). L'evasione è una diretta conseguenza delle alterazioni delle cellule tumorali, che riguardano soprattutto i meccanismi di processazione e presentazione antigenica o la via di segnalazione del recettore per IFN- γ . Queste alterazioni riducono, da una parte, il riconoscimento e l'eliminazione degli antigeni tumorali ("tumor ignorance") ed attivano, dall'altra, la capacità delle cellule neoplastiche di ostacolare le funzioni protettive del sistema immunitario. Quest'ultimo processo può derivare dalla sovrapproduzione da parte delle cellule trasformate di citochine inibitorie, quali TGF- β o IL-10 (Khong and Restifo 2002), o altri inibitori della risposta dei linfociti T, come la galectina-1 (Rubinstein, Alvarez et al. 2004) e IDO (indoleamina 2,3-diossigenasi)

(Uyttenhove, Pilotte et al. 2003), oppure da modificazioni nel reclutamento e nel differenziamento di diverse popolazioni cellulari. Il sistema immunitario ha evoluto parecchi meccanismi e popolazioni cellulari per controllare la sua attivazione e indurre tolleranza verso le cellule T autoreattive. Il tumore può impiegare a suo vantaggio questi stessi meccanismi: ad esempio, può indurre un differenziamento alterato delle cellule dendritiche (DC) in fenotipi più immaturi non funzionali (iDC). In pazienti affetti da tipi diversi di tumore, ad esempio, è stata riscontrata una notevole diminuzione delle DC ed una prevalenza, tra queste, di fenotipi immaturi che esprimono livelli bassi o nulli di molecole costimolatorie (CD80, CD86). Un numero ridotto di cellule presentanti l'antigene (APC) rende la stimolazione immune poco efficace e la presenza di iDC, che non forniscono un adeguato segnale costimolatorio alle cellule T, può provocare anergia dei linfociti T. È stato proposto che diversi fattori derivanti dal tumore, tra cui VEGF, IL-10, IL-6 e M-CSF, attivando costitutivamente il fattore trascrizionale STAT3 ed inibendo NF-κB (nuclear factor κB), siano responsabili di questo blocco maturativo delle DC che contribuisce alla soppressione di risposte immuni tumore-specifiche (Gabrilovich 2004).

Sono principalmente tre le popolazioni che agiscono da regolatrici della risposta immunitaria: le T regolatorie (Treg) ovvero cellule T $CD4^+CD25^+FOXP3^+$, le cellule NKT (cellule T Natural Killer) regolatorie e le cellule mieloidi soppressorie (MDSC). Queste diverse popolazioni agiscono impiegando meccanismi che non prevedono il riconoscimento antigenico e, attualmente, sta emergendo come un'interazione tra queste diverse popolazioni cellulari sia un'importante evento della regolazione negativa della risposta immune. Le cellule Treg sono state inizialmente riscontrate in malattie autoimmuni, dove sembrano agire sopprimendo la risposta autoreattiva mediata da linfociti T $CD4^+$. Più recentemente si è scoperto che queste cellule, costituenti circa il 10% dei linfociti T $CD4^+$ circolanti in animali sani, sopprimono la risposta immunitaria, mediata sia da linfociti T $CD4^+$ che da $CD8^+$, anche in risposta a patogeni e tumori. Le cellule Treg comprendono in realtà, una composita famiglia di cellule regolatorie. Tra queste particolarmente studiate in campo dell'immunologia dei tumori sono le $CD4^+CD25^+FOXP3^+$: la deplezione di queste cellule *in vivo*, mediante l'impiego di anticorpi anti-CD25 (PC61), prima del challenge col tumore aumenta, infatti, l'immunosorveglianza mediata da CTL tumore-specifici, $CD4^+$ e cellule NK,

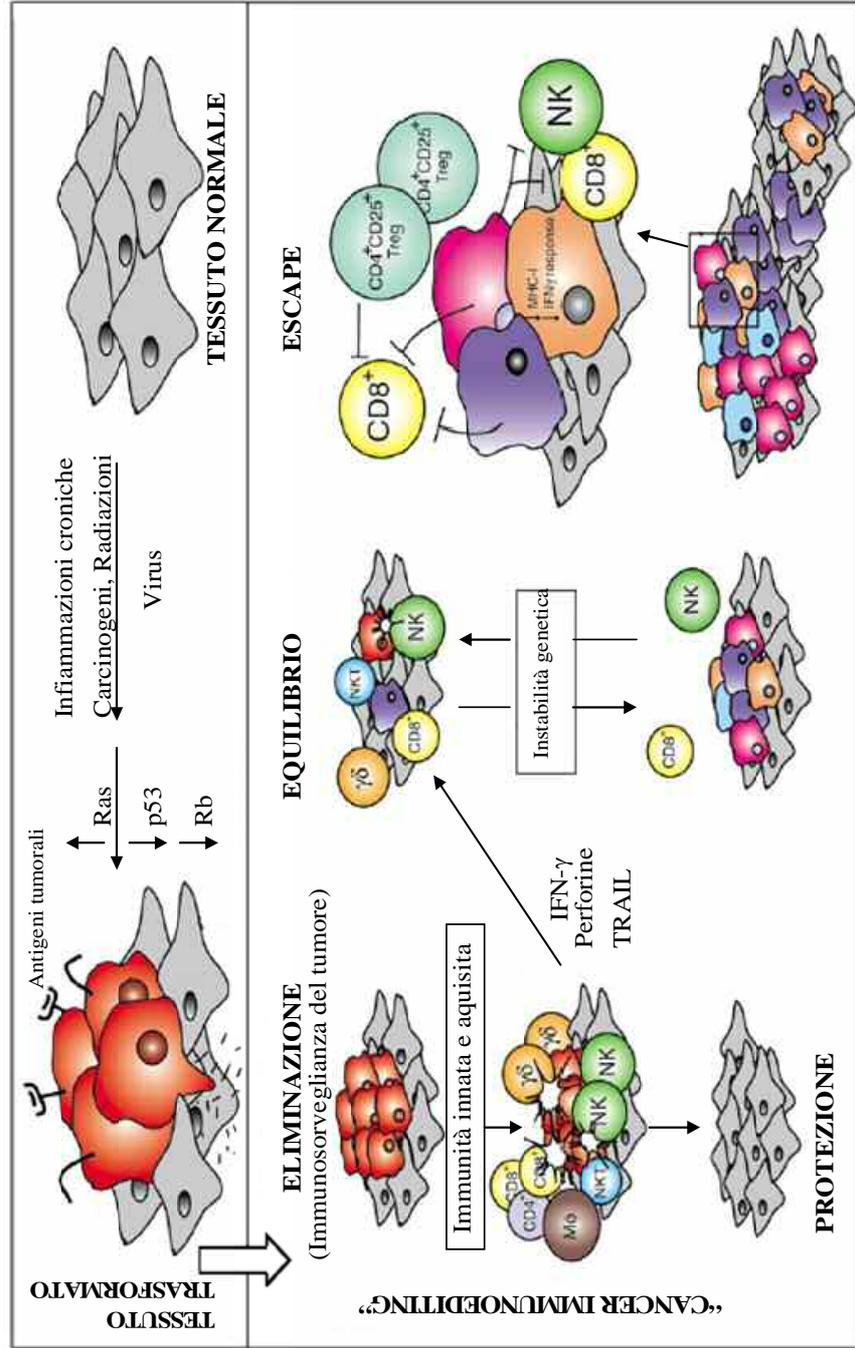


Figura. 1: Schematizzazione del "Cancer Immunoeediting".

(Figura tratta e modificata da Dunn et al. "The immunobiology of cancer immunosurveillance and immunoeediting" *Immunity* 21(2): 137-48)

induce il rigetto di diversi tumori immunogenici in vari ceppi murini ed aumenta l'efficacia di vaccini anti-tumorali (Onizuka, Tawara et al. 1999). La presenza di queste cellule è stata riscontrata anche nell'uomo, con effetti soppressori su linfociti T CD4⁺ e CD8⁺; in diversi pazienti affetti da tumore è stato riportato un aumento della frazione di questa popolazione nel sangue periferico e, in tumori gastrointestinali, la percentuale di CD4⁺ CD25⁺FOXP3⁺ sembra correlare inversamente con la prognosi (Sasada, Kimura et al. 2003; Wolf, Wolf et al. 2003; Terabe and Berzofsky 2004).

Le cellule NKT sono una sottopopolazione di linfociti T implicata nella regolazione della risposta immunitaria associata con malattie autoimmuni, malattie infettive e cancro. Riconoscono antigeni glicolipidici presentati da molecole CD1d, attraverso un recettore TCR che comprende una catena invariante α . Inoltre, possono regolare le risposte immunitarie sia promuovendo la secrezione di citochine Th1 e Th2 tra cui IFN- γ , IL-4 ed IL-13, o reclutando altre cellule immunosoppressive. Il meccanismo immunosoppressivo sembra mediato dalla produzione di IL-13, che in topi con tumore è aumentata rispetto agli animali naïve e che, agendo attraverso la via di IL-4R α -STAT6, sopprime l'azione di rigetto del tumore mediata dai CTL tumore-specifici. Probabilmente l'IL-13, anziché agire direttamente sui CTL, induce le cellule mieloidi CD11b⁺Gr-1⁺ a produrre TGF- β , una citochina che è in grado di sopprimere la funzione dei CTL CD8⁺ (Terabe, Matsui et al. 2000; Terabe and Berzofsky 2004). L'attività regolatoria delle cellule mieloidi CD11b⁺Gr-1⁺ è dipendente dall'interazione di due enzimi inducibili: arginasi 1 (ARG1) e ossido nitrico sintetasi 2 (NOS2) (Bronte and Zanovello 2005). Le MDSC utilizzano ARG1 e NOS2 per inibire la risposta dei linfociti T verso gli antigeni, separatamente o in combinazione, a seconda dei segnali dettati da citochine o da molecole di membrana coinvolte nell'interazione tra le MDSC e i linfociti T attivati. Il fenomeno principale legato all'induzione dell'enzima ARG1 è la deregolazione della catena CD3 ζ , elemento principale della trasduzione del segnale del TCR, con una conseguente riduzione della proliferazione in linfociti T attivati. In particolare, sembra che negli stadi iniziali della crescita tumorale la downregolazione della catena ζ e l'inibizione della funzionalità linfocitaria siano eventi ristretti ai linfociti infiltranti il tumore, mentre negli stadi avanzati i fenomeni si osservino anche in cellule T circolanti in periferia (Baniyash 2004). L'ossido nitrico (NO) può regolare negativamente le

proteine coinvolte nella segnalazione intracellulare sia direttamente, tramite S-nitrosilazione di residui cisteinici cruciali, sia indirettamente, attivando la guanilato ciclastasi solubile e la protein chinasi dipendente da cGMP. Nei linfociti T il NO agisce bloccando la fosforilazione, e quindi l'attivazione, di proteine coinvolte nelle tre principali vie di segnalazione del recettore per l'IL-2 (JAK/STAT, Ras/MAPK, fosfoinositolo 3-chinasi/Akt), quali JAK1, JAK3, STAT5, ERK e AKT (Mazzoni, Bronte et al. 2002). Inoltre, la deplezione di L-arginina citosolica da parte dell'ARG1 delle MDSC modifica l'attività di NOS2, favorendo la produzione di anione superossido (O_2^-) dal dominio reduttasico dell'enzima (Xia and Zweier 1997; Xia, Roman et al. 1998; Bronte, Serafini et al. 2003). L' O_2^- si combina velocemente con altre molecole generando intermedi reattivi dell'azoto, noti anche come RNOS (reactive nitrogen-oxide species), tra cui i più noti sono i perossinitriti, e specie reattive dell'ossigeno, i ROS (reactive oxygen species), tra cui il perossido di idrogeno H_2O_2 . Entrambe queste classi di composti sono note per la loro capacità di inibire la proliferazione dei linfociti T: a) fungendo da messaggeri intra- e intercellulari in grado di indurre modifiche posttraduzionali, mediante la nitratura di residui tirosinici delle proteine che influenzano diverse attività biologiche, come l'attivazione/inattivazione enzimatica, il differenziamento e la proliferazione cellulare (Schopfer, Baker et al. 2003; Radi 2004); b) inducendo l'apoptosi in linfociti T attivati dall'antigene, mediante la deregolazione dei livelli intracellulari della proteina anti-apoptotica BCL-2 e l'aumento dei livelli di FasL attraverso segnalazione mediata da NF- κ B (Hildeman, Mitchell et al. 2003).

In sintesi, il concetto del "*Cancer Immunoediting*" ci fornisce una visione dinamica e, in un certo senso, darwiniana dell'interazione tra sistema immunitario e tumore, tale per cui le cellule tumorali sottoposte alla pressione selettiva del sistema immunitario tendono a selezionare patrimoni genetici codificanti caratteristiche fenotipiche via via sempre più aggressive, capaci alla fine di sfuggire al controllo del sistema stesso. Questa caratteristica mobile del rapporto tra sistema immunitario e tumore deve essere sempre tenuta presente nell'iniziare qualsiasi approccio immunoterapico e soprattutto nel giudicare l'efficacia dell'approccio stesso.

Immunoterapia e tumori

I successi ottenuti nell'ambito della vaccinoterapia anti-infettiva hanno di fatto acceso le speranze che quest'approccio possa sortire effetti altrettanto promettenti anche nell'ambito della terapia oncologica. Si tratta, tuttavia, di un'applicazione che differisce sensibilmente per premesse ed intenti rispetto all'impiego di vaccini in patologie infettive. Utilizzata come profilassi di infezioni batteriche o virali, la vaccinoterapia predispone l'organismo a contrastare efficacemente eventuali patogeni, mediante l'induzione di una risposta immunologica efficace e duratura a seguito dell'incontro con lo stesso patogeno reso innocuo e somministrato, talvolta, in presenza di peculiari stimoli adiuvanti. La vaccinoterapia come la profilassi delle malattie infettive si propone quindi di sensibilizzare l'organismo ospite per un eventuale futuro incontro con l'antigene, rappresentato nella maggior parte dei casi da proteine non-*self* fortemente immunogeniche. Diversa, invece, la situazione per ciò che attiene agli approcci vaccinali antineoplastici che, escluse alcune eccezioni, si propongono *in primis* di generare una risposta immunitaria terapeutica, ovvero in presenza di malattia conclamata, nei confronti di antigeni *self* verso cui verosimilmente esiste uno stato di tolleranza immunologica. I limiti di quest'ultimo approccio sono molteplici. Esiste talora, come detto, una forte tolleranza centrale e periferica nei confronti di antigeni tumorali che altro non sono che proteine *self*, talvolta mutate, ma spesso normali o semplicemente iper-esprese. Parlare di tolleranza significa far luce su uno dei capitoli forse più complessi dell'immunologia, che comprende eventi precoci timici di delezione di precursori linfocitari potenzialmente autoreattivi ed eventi invece più tardivi, che vanno sotto il nome di tolleranza periferica, e che comprendono fenomeni di anergizzazione mediata spesso da altri effettori del sistema immune che proteggono l'organismo da potenziali aggressioni autoimmuni. Recenti acquisizioni hanno altresì dimostrato, sulla scorta di sempre più efficaci tecniche di biologia molecolare e proteomica, una discreta varietà di nuovi antigeni tumore-associati riconosciuti dai linfociti T umani e murini che, mutuando una vecchia classificazione, possono esser distinti in:

- prodotti di mutazioni geniche (ad esempio, antigene Caspase-8 del carcinoma della testa e del collo la cui mutazione nel codone di stop causa la lettura di una porzione non codificante in 3'; oncogene p21ras con mutazioni puntiformi in posizione 12): si tratta di forme alterate di geni

cellulari normali che controllano la proliferazione e la differenziazione cellulare. I proto-oncogeni, come spesso vengono chiamati, possono essere mutati per mutazioni puntiformi, delezioni o traslocazioni cromosomiche indotte da carcinogeni, così da formare oncogeni i cui prodotti posseggono attività trasformante.

- prodotti di geni silenti, di norma non espressi sulla maggior parte dei tessuti (ad esempio MAGE-1, BAGE, GAGE (Kobayashi, Higashi et al. 2000)): trattasi di geni che non sono normalmente espressi nei tessuti normali (con l'eccezione del testicolo e della placenta), o lo sono durante le fasi precoci dello sviluppo embrionale, prima che i meccanismi della tolleranza verso il *self* siano operativi.
- prodotti di geni virali in tumori maligni associati ad infezioni virali (ad esempio, antigene T del SV40, prodotto del gene EBNA-1 del virus di Epstein-Barr (Kanegane, Nomura et al. 2002)): alcuni tumori presentano di solito il genoma provirale integrato nel patrimonio genetico della cellula ospite, conseguentemente le cellule neoplastiche esprimono spesso antigeni codificati dal genoma virale; le relative proteine vengono sintetizzate endogenamente, processate, complessate con le molecole MHC di classe I e quindi espresse in membrana. In tal modo le cellule neoplastiche sono in grado di essere riconosciute da linfociti T specifici.
- prodotti di geni di differenziazione espressi da cellule dell'istotipo da cui il tumore deriva (ad esempio, tirosinasi, gp100 (Stennett, Riker et al. 2004), MART-1 (Fetsch, Marincola et al. 1999)): sono proteine espresse da cellule normali, caratteristiche di un particolare tipo di tessuto in un determinato stadio del suo normale differenziamento; nel caso del melanoma/melanociti gli antigeni di questo gruppo sono quasi tutti enzimi del ciclo biosintetico della melanina.

Dato che è la stessa cellula tumorale a sintetizzare la proteina antigenica, questa viene processata al livello del citosol dal proteosoma, ed i peptidi che ne derivano sono trasportati dal complesso TAP (*Transporter associated with Antigen*) nel reticolo endoplasmatico dove si legano alle molecole MHC di classe I. Il complesso così costituito, esposto a livello della membrana plasmatica, potrà essere riconosciuto dal TCR specifico.

E' da sfatare, quindi, il vecchio assunto in base al quale il tumore era considerato poco antigenico; una nuova definizione di scarsamente immunogenico sembra, alla luce delle attuali conoscenze, più appropriata e corretta. La possibilità che a condizionare la scarsa efficacia della risposta non sia l'assenza di antigene ma la circostanza ambientale e temporale nella quale il sistema immunitario viene a contatto con il tumore apre per la vaccinoterapia antitumorale promettenti spazi d'intervento. Quale sia l'antigene da scegliere, la strategia adiuvante da utilizzare, che tipo di risposta immune debba essere generata e come mantenerne l'efficacia a lungo termine sono solo alcuni degli interrogativi che ad oggi risultano solo parzialmente delucidati.

Volendo descrivere, sia pur sinteticamente, quali siano i principali tipi d'interventi immunologici, in corso o futuribili, é necessario ricorrere inevitabilmente a schematismi, che possono non sempre render conto della complessità del sistema su cui deve agire l'approccio d'immunoterapia. Esistono, infatti, approcci classificabili come interventi d'immunoterapia passiva ed altri noti come immunoterapia attiva. Nel primo caso ci si riferisce a strategie basate sull'impiego di effettori prodotti *in vitro* o *ex-vivo*, quali anticorpi o linfociti attivati, e trasferiti nell'ospite portatore di tumore; nel secondo caso, si fa riferimento ad interventi che hanno lo scopo di indurre *in vivo*, nell'ospite stesso una risposta immunitaria antitumorale specifica.

Nell'ambito dell'immunoterapia attiva, tre sono fondamentalmente le strategie che possono essere associate all'immunizzazione con un antigene tumorale per evocare e amplificare la risposta immunitaria:

- aumento di efficacia della presentazione antigenica: l'impiego di mediatori (come ad esempio GM-CSF, Flt3 ligando, CD40L) in grado di mobilitare e reclutare cellule APC (Koya, Kasahara et al. 2003), il ricorso a ingegnerizzazione delle stesse mediante l'uso di vettori virali o ligandi chimerici e l'impiego come immunogeno di cellule tumorali indotte ad esprimere citochine e/o molecole costimolatorie sono solo alcune delle strategie impiegate a tal scopo (Larin, Georgiev et al. 2004).
- interferenza con i meccanismi di tolleranza al *self*: diversi sono ad oggi i meccanismi noti che regolano quella che viene definita tolleranza periferica e che consiste nel silenziamento di eventuali risposte verso antigeni *self*. Esistono, infatti, cellule regolatrici sia del comparto linfoide

(CD4⁺CD25⁺FOXP3⁺) (Feunou, Poulin et al. 2003; Colombo and Piconese 2007) che mieloidi (CD11b/Gr1) (Bronte, Apolloni et al. 2000; Bronte, Serafini et al. 2003; Bronte and Zanovello 2005) in grado di interferire con il priming e la fase effettrice di risposte immuni verso antigeni *self*. L'utilizzo tra le strategie adiuvanti di approcci capaci di alterare l'attività inibitoria di queste popolazioni cellulari si è dimostrato in grado di implementare e rendere efficace una risposta immune verso antigeni *self*, rompendo in tal modo la tolleranza immunologica.

- induzione di un homing preferenziale al sito tumorale: la possibilità di veicolare linfociti antigene-specifici nel sito tumorale resta ad oggi forse la strategia ad oggi meno esplorata e di maggior interesse.

Immunoterapia attiva: la sfida della vaccinazione a DNA

L'immunoterapia attiva consiste nell'attivazione ed espansione del repertorio immunitario endogeno al fine di indurre l'immunità dell'ospite verso gli antigeni tumorali. Gli interventi vaccinali si basano, conseguentemente, nel somministrare l'antigene in un individuo in modo da attivare gli effettori immunitari. Ad oggi molti interventi di vaccinazione sono stati studiati nell'ambito dell'oncologia. I vaccini di prima generazione, ancor oggi utilizzati in trials clinici (Vilella, Benitez et al. 2003), sfruttano la somministrazione nel paziente delle cellule tumorali uccise o dei loro lisati. Il vantaggio di questi vaccini è che non richiedono la caratterizzazione completa degli antigeni tumorali. D'altro canto, le principali limitazioni ai fini dell'approvazione da parte delle autorità regolatorie sono la parziale caratterizzazione di tali preparazioni (cellule intere o lisati) ed il rischio che questi vaccini inducano risposte immuni contro numerosi antigeni *self* espressi anche dalle cellule normali. Perciò, nel contesto di un'incalzante esigenza di standardizzazione e regolamentazione, molti sforzi puntano oggi alla definizione di vaccini molecolari diretti contro antigeni ben caratterizzati. In quest'ottica si inquadrano i vaccini di seconda generazione che comprendono l'utilizzo delle DC, di peptidi e dei vaccini genetici. Il rationale della vaccinazione a DC si basa sulle caratteristiche funzionali di queste cellule che esprimono livelli di molecole MHC circa 50 volte più elevati dei macrofagi ed alti livelli di molecole di adesione e di costimolazione richieste per l'attivazione delle cellule T naïve, rappresentando conseguentemente la più efficace cellula APC

disponibile. I protocolli ad oggi utilizzati sfruttano DC, isolate o indotte mediante il fattore stimolante colonie di monociti-granulociti (GM-CSF) ed IL-4 da precursori midollari o da monociti circolanti (Hsu, Benike et al. 1996; Thornburg, Boczkowski et al. 2000), maturate con lisati di cellule tumorali, caricate con i peptidi antigenici o transfettate con le sequenze codificanti l'antigene di interesse. Lavori recenti hanno dimostrato che l'espressione sostenuta dell'antigene nelle DC combina la stimolazione antigene-specifica con una potente costimolazione; inoltre, attraverso la selezione di epitopi *ad hoc*, estende le potenzialità dell'immunizzazione oltre le restrizioni imposte dai fenotipi HLA individuali dei pazienti (Nagorsen, Panelli et al. 2003).

I più clinicamente traslabili per un approccio vaccinale sono i peptidi antigenici, frammenti amminoacidici identificati come epitopi immunodominanti riconosciuti dai TIL. Questa tipologia di vaccini presenta la possibilità di migliorare le caratteristiche antigeniche dei peptidi costituenti il vaccino, attraverso tecniche biochimiche di sostituzione o modificazione amminoacidiche (ligandi peptidici alterati, APL) e di evocare risposte puntuali verso uno o più antigeni tumorali, limitando la comparsa di reazioni autoimmunitarie o effetti immunosoppressivi spesso associati all'impiego di antigeni più complessi, come cellule tumorali intere (Romero, Cerottini et al. 2004).

La vaccinazione genica rappresenta una modalità innovativa per esprimere antigeni *in vivo* in modo da stimolare una risposta immunitaria sia umorale che cellulare. L'idea dell'utilizzo di vaccini a DNA nell'ambito dell'immunoterapia nasce dall'osservazione che l'inoculo di un plasmide codificante per la β -galattosidasi di *E. coli*, a livello del tessuto muscolare di topo, era in grado di determinare la produzione da parte di tali cellule eucariotiche della proteina batterica (Wolff, Malone et al. 1990). Successivamente venne dimostrato che tali plasmidi erano capaci di attivare effettivamente il sistema immunitario contro la proteina codificata dalla sequenza genica inoculata. Infatti, animali inoculati con il plasmide codificante per il gene della nucleoproteina del virus dell'influenza A erano in grado di sviluppare una risposta immunitaria specifica, sia di tipo umorale che cellulare, capace di proteggerli dal successivo incontro con il patogeno (Ulmer, Donnelly et al. 1993).

La costruzione di un vaccino a DNA è un processo piuttosto semplice, basato essenzialmente nel trasferimento della sequenza genica codificante l'antigene

d'interesse all'interno di un vettore plasmidico dotato di quattro caratteristiche fondamentali: un'origine di replicazione procariotica, una resistenza ad un antibiotico, un potente promotore eucariotico ed una sequenza di poliadenilazione. Successivamente, tale plasmide viene introdotto in batteri competenti, amplificato e quindi estratto per essere inoculato nell'ospite, una volta disciolto in una soluzione salina. La sicurezza di tale strategia è garantita dal fatto che, se pur l'immunizzazione mima i normali processi infettivi, tali vettori non sono in grado di integrarsi nel genoma dell'ospite e non possono originare forme patogene pericolose come potrebbe accadere con l'utilizzo di vettori virali o batterici.

La vaccinazione a DNA presenta due aspetti interessanti per le implicazioni nell'attivazione del sistema immunitario. In primo luogo il DNA funge da veicolo per indurre la produzione della proteina antigenica. In questo modo sono le stesse cellule dell'ospite a sintetizzare e processare la proteina antigenica che, analogamente alle proteine endogene, viene digerita a livello del proteosoma ed i relativi peptidi montati su molecole MHC di classe I presentati sulla superficie cellulare per essere riconosciuti dai linfociti T con TCR specifico. Inoltre, la proteina viene anche rilasciata dalle cellule transfettate, catturata e processata dalle cellule APC, cui spetta il compito di attivare i linfociti T e B vergini, tramite "cross-presentation" (Doe, Selby et al. 1996) (Figura 2). Il vettore plasmidico a DNA non possiede la sola funzione di codificare la proteina antigenica, ma viene altresì sfruttato in virtù della presenza, sulle porzioni non codificanti, di sequenze ripetute, proprie del genoma procariotico, in grado di attivare effettori dell'immunità innata dell'ospite (Krieg 2002). Tali proprietà sono contenute nelle sequenze ipometilate di dinucleotidi citosina-fosfato-guanina (CpG), presenti con frequenza di circa 20 volte maggiore nel genoma procariotico rispetto a quello eucariotico.

A fronte della facilità con cui tali vaccini sono costruiti, la dose, la sede e la modalità con cui essi vengono somministrati, sono parametri fondamentali nell'influenzare qualitativamente e quantitativamente la risposta immunitaria. Le strategie più utilizzate sono due: la metodica "gene-gun" e l'inoculazione intramuscolare di DNA in soluzione salina. L'approccio del "gene-gun" consiste nel far adsorbire il DNA su microparticelle d'oro che successivamente verranno "sparate" nel derma dell'animale tramite la propulsione fornita da elio pressurizzato. Il grande vantaggio di questa strategia è la modesta quantità di

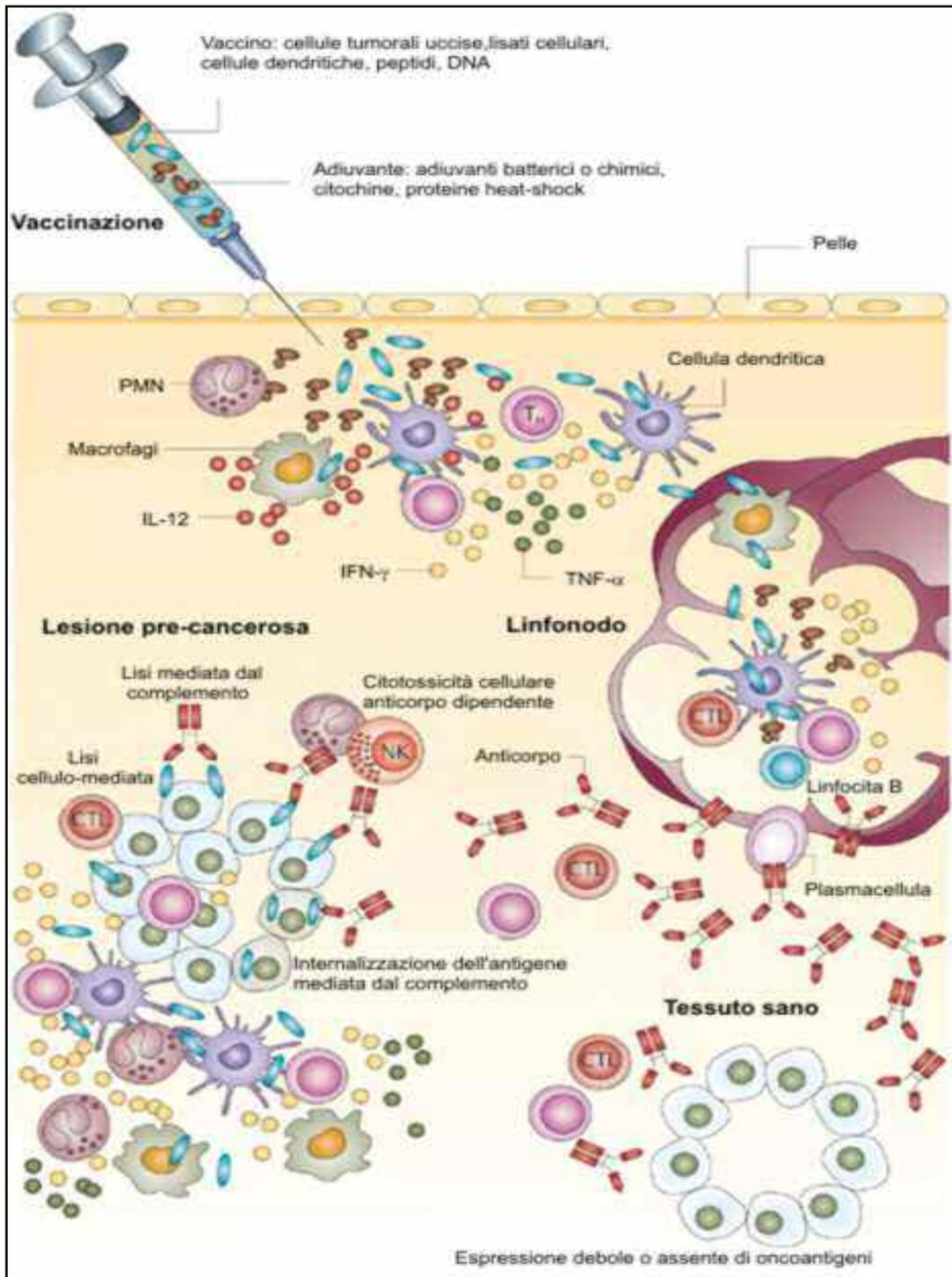


Figura 2: Il vaccino a DNA come veicolo per attivare il sistema immunitario.

Il vaccino   in grado di attivare sia una risposta immunitaria cellulare che una risposta immunitaria umorale in grado di attaccare le lesioni precancerose, esprimenti l'antigene, ma non i tessuti sani, in cui l'espressione dell'antigene   debole o assente.

(Figura modificata da originale presente in Lollini et al. "Vaccines for tumor prevention". *Nature Review*, 2006 6: 204-216)

DNA necessario a stimolare la risposta immunitaria che difatti è dell'ordine di grandezza dei nanogrammi (ng). L'inoculo intramuscolare di DNA in soluzione salina, al contrario, richiede quantità di DNA dell'ordine di grandezza dei microgrammi (μg) per indurre una piena attivazione degli effettori immunologici. Utile in quest'ultimo approccio l'impiego di sostanze citotossiche quale la cardiotossina, che inocolata a livello del muscolo, usuale sede di vaccinazione, alcuni giorni prima della vaccinazione è in grado di migliorare la transfettabilità dei miociti in rigenerazione a seguito della necrosi indotta dalla tossina (Bronte, Cingarlini et al. 2003). Altre procedure sfruttano, al contrario, veicoli quali colloidali o liposomi per aumentare l'efficacia del trasferimento del vaccino all'interno della cellula, potenziando di conseguenza la capacità della cellula di sintetizzare la proteina antigenica attivando una migliore risposta immunitaria. Tale potenziamento può essere altresì ottenuto mediante elettroporazione della sede in cui viene somministrato il vaccino. Infatti, l'applicazione di un impulso elettrico, determinando un transiente aumento della permeabilità delle cellule, favorisce l'ingresso in sede intracellulare di una maggior quota di DNA destinato alla trascrizione e successiva traduzione (Widera, Austin et al. 2000).

L'efficacia di questa modalità vaccinale è dimostrata dall'inibizione della cancerogenesi in topi transgenici Balb-neuT che overesprimono l'oncogene trasformante rHer-2/neu nell'epitelio delle ghiandole mammarie e sviluppano spontaneamente carcinoma della mammella (Quaglino, Iezzi et al. 2004). Per potenziare le vaccinazioni a DNA sono state inoltre sperimentate numerose strategie adiuvanti, alcune delle quali prevedono il coinoculo, unitamente al vaccino, di sequenze geniche codificanti per citochine (Calarota and Weiner 2004), la somministrazione esogena delle stesse citochine o molecole costimolatrici, ed ancora, l'abbinamento del vaccino con anticorpi depletanti o attivanti pathway cellulari differenti. Tra gli esempi forse più meritevoli di menzione, che hanno anche avuto ed avranno importanti riscontri clinici, è senza dubbio da ricordare l'uso di citochine quali GM-CSF, IL-2 ed interferoni (Pavlenko, Roos et al. 2004). La scelta della sede d'inoculo riveste altresì un'importanza fondamentale nell'innescare ed indirizzare la risposta immunitaria. Infatti, come riportato in letteratura, l'inoculazione intramuscolo induce preferenzialmente risposte Th1 mentre la somministrazione intradermica, attiva una risposta Th2 (Pertmer, Eisenbraun et al. 1995).

L'immunoterapia antitumorale basata sulla vaccinazione a DNA si propone, quindi, di rompere la tolleranza immunitaria contro i TAA, che sono frequentemente antigeni *self*. La tolleranza verso tali antigeni si esprime talora nell'impossibilità di generare risposte immuni di lunga durata, in altri termini nell'incapacità di generare risposte memoria. Una possibilità per superare questo limite può consistere nel mantenere l'attivazione linfocitaria con richiami di vaccinazione ripetuti. A questo scopo, sono state sperimentate diverse tempistiche di vaccinazione. Una delle strategie impiegate consiste nell'inoculo di DNA codificante per una proteina tumore-associata, seguito dalla somministrazione di un vettore virale codificante per lo stesso antigene. Il razionale di tale approccio risiede nella possibilità di esporre l'ospite ad una ripetuta dose di antigene, ovviando ai limiti dell'immunizzazione con i soli vettori virali. L'inevitabile immunità umorale diretta contro proteine del capsido virale, che si genera già dal primo incontro con le stesse, ne preclude di fatto un impiego ripetuto. Questa strategia ha portato ad incoraggianti risultati nella prevenzione della malaria, che potrebbero auspicabilmente esser traslati in clinica (Moore and Hill 2004). Altri protocolli al contrario sfruttano l'inoculo del vaccino a DNA seguito dalla somministrazione di cellule ingegnerizzate per l'espressione di citochine o interferoni (Quaglino, Rolla et al. 2004), o schedule di vaccinazioni basate sulla somministrazione ripetuta del vaccino a DNA (Quaglino, Iezzi et al. 2004).

A fronte di questo vasto scenario di protocolli vaccinali, tuttavia le risposte cliniche oggettive dell'immunizzazione con i vaccini di seconda generazione restano rare ed inefficaci per l'eradicazione della malattia. Il problema più ricorrente negli approcci clinici che sfruttano questi approcci vaccinali per la generazione di cellule T è la limitata disponibilità di DC autologhe. A causa della malattia o del trattamento al quale il paziente è sottoposto, le DC sono spesso poco vitali o funzionalmente danneggiate e, di conseguenza, clinicamente non utilizzabili (Grover, Kim et al. 2006). L'impossibilità di generare una risposta immune efficace è collegata inoltre al microambiente tumorale, che come descritto in precedenza è affollato da cellule di origine mieloide o linfoide che limitano la proliferazione degli effettori immunitari. In particolare, la presenza di due citochine (IL-10 e TGF- β) è stata associata all'inibizione della risposta immunitaria nei confronti del tumore. IL-10 è stata descritta capace di inibire la fase di *priming* dei linfociti T da parte delle DC *in vitro* (Steinbrink, Jonuleit et al.

1999); inoltre, la sua presenza nel siero dei pazienti di certi tipi di tumore è stata correlata ad una prognosi più sfavorevole (Wittke, Hoffmann et al. 1999). TGF- β è stato descritto esser associato alla generazione della popolazione linfocitaria regolatoria CD4⁺CD25⁺FOXP3⁺ (Peng, Laouar et al. 2004). Un dato interessante, a conferma dell'importanza di queste due fattori solubili, è stata un'indagine *gene-array* di biopsie di pazienti affetti di melanoma nella quale è stato evidenziato come i trascritti di IL-10 e TGF- β risultino up-regolati (Harlin, Kuna et al. 2006). Un dato che può in parte spiegare la mancata efficacia della vaccinoterapia antitumorale è il fatto che i pazienti arruolati nei diversi trials clinici sono soggetti che presentano una malattia conclamata e di età, nella maggior parte dei casi, avanzata. Infatti, i pazienti sottoposti agli interventi vaccinali presentano una età media di 65-80 anni, un arco temporale in cui la produzione di linfociti T naïve da parte del timo è arrestata da tempo. Conseguentemente la risposta al vaccino dipenderà dal repertorio dei linfociti T memory selezionato durante la vita del soggetto, e questo limita fortemente l'innescarsi di una risposta efficace. La presenza di un tumore avanzato ed in alcuni casi metastatico, inoltre, esacerba quei fenomeni soppressivi descritti in precedenza limitando la possibilità di ottenere una risposta terapeutica efficace (Finn 2003).

Immunoterapia passiva: il successo del trasferimento adottivo degli effettori immunitari CD8⁺

Secondo la definizione di Steven Rosenberg, l'immunoterapia cellulare è il trasferimento in un organismo ospite di cellule immuni con lo scopo di introdurre nuove funzioni o di correggere quelle difettive. L'entusiasmo riposto in questo approccio deriva dalla possibilità di manipolare, *ex vivo*, vie biologiche cellulari e molecolari in un modo che non sarebbe altrimenti possibile nell'ospite "intatto" (Dudley, Wunderlich et al. 2002).

Nell'uomo i primi approcci di trasferimento adottivo si basavano nel trasferimento di cellule killer attivate da linfocine (LAK) caratterizzate da un'attività citotossica non HLA-ristretta (Rosenberg, Mule et al. 1985) derivata in gran parte dalle cellule NK circolanti. L'utilizzo delle cellule LAK, che hanno dato ottimi risultati nei modelli murini, ha generato nell'uomo risultati molto discutibili. Gli studi successivi si sono quindi indirizzati verso il trasferimento adottivo di linfociti T CD8⁺ caratterizzati da un'attività citotossica antigene specifica, HLA-

ristretta. Recenti osservazioni hanno dimostrato che l'efficacia terapeutica del trasferimento adottivo cellulare (ACT), sia nei modelli murini che nei trials clinici, è influenzato dallo stadio maturativo del linfocita T CD8⁺ (Gattinoni, Klebanoff et al. 2005). La popolazione dei linfociti T viene suddivisa classicamente in quattro stadi maturativi: CD8⁺ naïve, CD8⁺ effettori precoci, CD8⁺ effettori intermedi e CD8⁺ effettori tardivi. Tale suddivisione si basa sull'analisi fenotipica di alcuni cluster di differenziazione (CD), sulla lunghezza dei telomeri e sull'espressione genica (Appay, Dunbar et al. 2002; Lanzavecchia and Sallusto 2002). Un aspetto indubbiamente interessante è legato all'osservazione che i linfociti T CD8⁺ effettori tardivi, se pur presentano un'ottima attività citotossica *in vitro*, risultano avere un debole impatto terapeutico *in vivo*, di circa 100 volte inferiore se paragonato a quello dei linfociti T CD8⁺ effettori intermedi (Sussman, Parihar et al. 2004; Wang, Huang et al. 2004). Una possibile spiegazione di questa diversa funzionalità può esser dovuta alla perdita del CD62L, una glicoproteina di membrana essenziale per l'homing del linfocita al linfonodo. L'incapacità del linfocita T di migrare nei linfonodi secondari correla con l'inefficacia terapeutica degli effettori immunitari ed evidenzia come il microambiente tumorale non sia grado di attivare da solo i linfociti T CD8⁺ (Kagamu, Touhalisky et al. 1996; Speiser, Miranda et al. 1997). Tuttavia, l'ACT basata sull'impiego di linfociti T effettori tardivi CD62L⁻CCR7⁻ ha portato a ottimi risultati terapeutici (Dudley, Wunderlich et al. 2002).

La ricerca sull'ACT si è oggi indirizzata verso i TIL isolati dalla massa tumorale o dai linfonodi limitrofi alla massa tumorale, in quanto nella maggior parte dei casi essi rappresentano una popolazione costituita da linfociti T CD8⁺ effettori intermedi e priva di NK (Rosenberg, Yannelli et al. 1994). I TIL possono essere espansi *in vitro* utilizzando anticorpi specifici per il CD3 e il CD28 o alte dosi di IL-2, sottoposti a selezione per generare linfociti con elevata avidità di riconoscimento dell'antigene tumorale e reinfusi nello stesso paziente in un contesto completamente autologo (Kawakami, Nishimura et al. 1993). Sebbene i protocolli per la generazione dei TIL siano tecnicamente complessi e costosi e non siano applicabili a tutti i pazienti, recenti risultati hanno rinnovato l'interesse verso questa forma di terapia tumorale.

Per incrementare l'efficacia terapeutica dell'ACT sono state sperimentate varie strategie tra le quali l'utilizzo di adiuvanti per promuovere la funzionalità dei

linfociti CD4⁺ Th1 endogeni, essenziali per mantenere l'attivazione degli effettori trasfusi (De, Miller-Graziano et al. 2005), la co-infusione di TIL e linfociti T CD4⁺ Th1 (Hu, Winter et al. 2000), la somministrazione di citochine IL-2, IL-7, IL-12, IL-15 (Rosenberg, Yannelli et al. 1994; Klebanoff, Khong et al. 2005), molecole antagoniste quali per esempio bloccanti di TGF- β (Suzuki, Kapoor et al. 2004), anticorpi anti-CTLA-4 (Sutmuller, van Duivenvoorde et al. 2001), ed anticorpi attivanti la funzionalità dei linfociti T (Grabert, Cousens et al. 2006). Una menzione speciale va fatta per la metodica della mielo-linfo-deplezione del paziente tramite radioterapia o chemioterapia, utilizzando farmaci quali Fludarabina o Ciclofosfamide, prima del trasferimento adottivo dei TIL (Cheever, Greenberg et al. 1980; Dudley, Wunderlich et al. 2002). Il razionale della mielo-linfo-deplezione consiste, in primo luogo, nell'eliminare le popolazioni linfocitarie endogene che competono per le citochine omeostatiche del pool linfocitario (IL-7, IL-15 e IL-2) e che, quindi, potrebbero ostacolare la proliferazione di linfociti T trasferiti (Muranski, Boni et al. 2006). In secondo luogo l'eliminazione delle popolazioni immuno-regolatorie sia del comparto linfoide (come i linfociti Treg CD4⁺CD25⁺FOXP3⁺) che mieloide (come le MDSC) potrebbe favorire l'azione effettrice delle cellule T trasferite. Inoltre, la mielo-linfo-deplezione è in grado di indurre delle modificazioni fenotipiche importanti nei linfociti T trasferiti. È stato descritto, infatti, come i TIL, che normalmente presentano una bassa espressione delle proteine di superficie CD28 e CD27, dopo trasferimento in pazienti mielo-linfo-depletati, esprimano entro breve tempo, alti livelli delle due proteine di membrana (Hendriks, Gravestien et al. 2000; Acuto and Michel 2003). L'espressione del CD28 e del CD27, oltre a migliorare l'efficacia citotossica, determina soprattutto un incremento della sopravvivenza dei TIL trasferiti (Powell, Dudley et al. 2005). Similmente anche il la catena α del recettore per IL-7 (IL-7R α), normalmente poco espresso a livello della membrana plasmatica dei TIL, viene iperespressa dopo trasferimento nei pazienti sottoposti a un regime mielo-linfo-depletivo (Kaech, Tan et al. 2003; Powell, Dudley et al. 2005).

Gli agenti chimici e ionizzanti, utilizzati per indurre la mielo-linfo-deplezione, sono in grado, inoltre, di modulare l'immunogenicità delle cellule tumorali stesse, determinando una maggior espressione di molecole MHC di classe I e proteine di membrana quali FAS e MUC-1, e questo, sia nei modelli murini che nei pazienti (Gelbard, Garnett et al. 2006). Ancora, recentemente è stato dimostrato che la

radiazione ionizzante non solo determina nelle cellule tumorali un aumento del numero di peptidi antigenici presentati in associazione alle molecole MHC di classe I, ma soprattutto, la sintesi di nuove ed uniche sequenze peptidiche, capaci di rendere più immunogenico il tumore stesso (Reits, Hodge et al. 2006). Infine, l'effetto citotossico della radiazione ionizzante determinando un locale danno tessutale ed uno stato di infiammazione, promuove la proliferazione delle DC autologhe che stimolano l'attivazione e l'espansione dei TIL trasferiti (Kieper, Troy et al. 2005). L' utilizzo della mielo-linfo-deplezione ha consentito di potenziare efficacemente l'ACT ottenendo risposte cliniche oggettive in circa il 50% dei pazienti con melanoma metastatico (Gattinoni, Powell et al. 2006) (Figura 3-A).

Accanto a procedure per potenziare l'efficacia terapeutica dell'approccio ACT e a traslarla nel contesto di tumori di diversa istologia, come ad esempio il trapianto delle cellule staminali ematopoietiche (HSC) in regime di mielo-linfo-deplezione prima dell'ACT (Wrzesinski, Paulos et al. 2007), la grande sfida che alimenta gli studi in questo settore è soprattutto il superamento del contesto autologo di questa procedura per ottenere una terapia "*Off-the-self*". In altre parole l'obiettivo è quello di poter trasferire effettori immunitari non più provenienti solamente dal paziente stesso ma anche da altri donatori, quali ad esempio pazienti che hanno risposto ottimamente all'ACT autologa o donatori sani. In questo modo sarebbe possibile costruire una libreria comune di cloni CTL specifici per vari antigeni tumorali, facilmente utilizzabile: i CTL potrebbero venir rapidamente testati contro le cellule tumorali di un paziente e una volta identificati quelli responsivi, amplificati e trasferiti nel malato. I primi trials clinici che sfruttano l'ACT allogenica sono risultati molto incoraggianti (Comoli, De Palma et al. 2004) (Figura 3-B). Più innovativi sono gli studi di terapia genica che mirano, invece, a ricostruire direttamente *in vitro* la reattività antigenica del linfocita che poi verrà trasferito nel paziente (Kershaw, Teng et al. 2005) Questi studi si basano sull'utilizzo di vettori lentivirali o retrovirali per indurre l'espressione di un TCR ad alta affinità verso l'antigene tumorale in linfociti T naïve ottenuti da un donatore sano. In questo modo è possibile condensare le caratteristiche funzionali di un linfocita T CD8⁺ effettore tardivo (TCR ad alta affinità) con quelle fenotipiche di un linfocita T CD8⁺ naïve (CD62L^{hi}CCR7^{hi}CD27^{hi}CD28^{hi}), ottenendo un potente effettore immunitario (Morgan, Dudley et al. 2006).

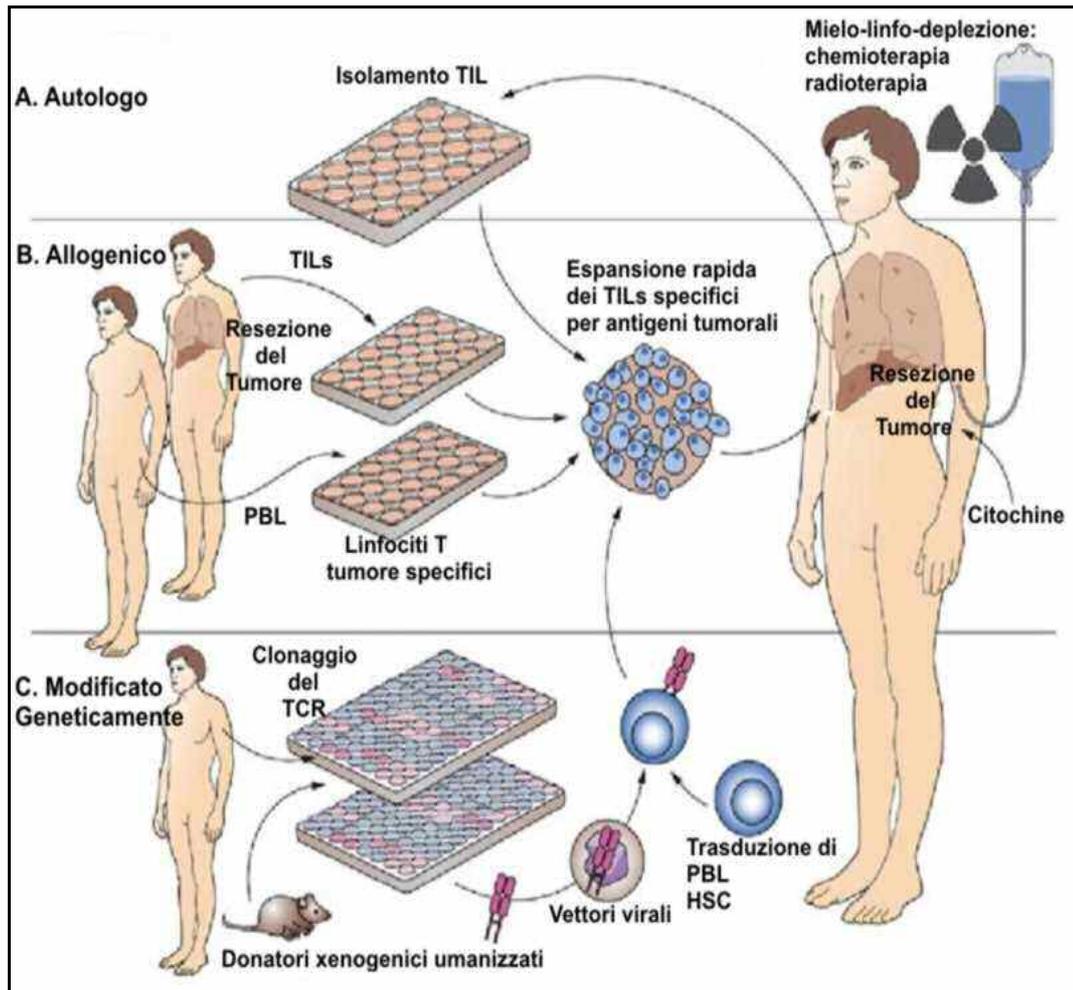


Figura 3: Possibili applicazioni del trasferimento adottivo cellulare associato alla mielo-linfo-deplezione del paziente sfruttando l'uso di differenti tipi di donatori di linfociti T in associazione alla somministrazione di citochine.

A) Trasferimento di linfociti T autologhi. I TIL vengono isolati dalla massa tumorale, espansi e reinfusi nel paziente dopo esser stato sottoposto ad un regime mielo-linfo-depletativo tramite onde ionizzanti o trattamento chemioterapico.

B) Trasferimento di linfociti T allogenici. I linfociti T possono esser generati o da un donatore sano o da un'altro paziente che ha risposto ottimamente al trattamento autologo. In questo caso è necessario una compatibilità tra i complessi di istocompatibilità del donatore con quelli del ricevente.

C) Trasferimento di linfociti T modificati geneticamente. I linfociti T possono esser generati tramite terapia genica usando vettori lentivirali o retrovirali oppure sfruttando donatori xenogenici esprimenti i geni del complesso MHC umano.

(Figura modificata da originale presente in Muranski P. et al. "Increased intensity lymphodepletion and adoptive immunotherapy-how far can we go?" *Nat. Clin. Pract. Oncol.* 2006 **3** (12): 668-681)

Futuribili ma molto interessanti, infine, sono gli studi che prevedono l'utilizzo di linfociti T da donatori xenogenici quali, ad esempio, i topi trasgenici HLA-A*0201 (HHD-mice). Questi animali sono knock-out per le molecole H2^{d/b} del complesso MHC murino e presentano la fusione delle molecole α -1 e α -2 del complesso HLA-A2 umano con la molecola α -3 del complesso H2 murino. Il sistema immunitario dei topi HHD risulta quindi "educato" esclusivamente dal complesso MHC umano. La potenzialità dell'utilizzo di donatori xenogenici è dovuta al fatto che il loro repertorio di linfociti T non è soggetto alla selezione negativa verso i peptidi *self* umani; pertanto, si potrebbero facilmente generare linfociti T con TCR ad alta affinità verso gli antigeni tumorali umani (Cohen, Zheng et al. 2005; Kuball, Schmitz et al. 2005) (Figura 3-C).

Telomerasi come antigene tumorale universale, candidato ideale per l'immunoterapia anti-tumorale.

I telomeri sono sequenze oligonucleotidiche non codificanti che chiudono le estremità dei cromosomi, costituite generalmente dalla ripetizione del motivo TTAGGG. Ad ogni ciclo cellulare si assiste ad un graduale accorciamento dei telomeri, e una volta raggiunta una lunghezza critica, la cellula attiva un programma genico di morte programmata (Hahn and Meyerson 2001). Alcuni tipi cellulari (cellule staminali, cellule germinali, linfociti attivati) risolvono questo problema attraverso l'attività dell'enzima telomerasi. La telomerasi è costituita da una componente di RNA, lunga circa 150 nucleotidi che serve da stampo per la sintesi del telomero; e da una componente proteica ad attività enzimatica (TERT) che funge da trascrittasi inversa, in grado di sintetizzare solo un segmento di DNA che è complementare alla sequenza di RNA (Cong, Wright et al. 2002). L'attivazione della telomerasi, intervenendo nel fenomeno di immortalizzazione cellulare, è stata descritta anche nelle cellule tumorali (Hastie, Dempster et al. 1990; Kim, Piatyszek et al. 1994; Meyerson, Counter et al. 1997; Shay and Wright 2002). In particolare essa è risultata esser espressa in circa l'85% delle cellule tumorali indipendentemente dalla loro origine o istologia e risulta essere pertanto un importante antigene tumorale universale (Vonderheide, Hahn et al. 1999). Anche se la ricerca di inibitori farmacologici dell'attività di telomerasi rappresenta una promettente strategia per una futuribile terapia anti-tumorale, le proprietà immunologiche di TERT suggeriscono che questa proteina sia un

potenziale bersaglio per nuovi approcci di immunoterapia contro il cancro. A tal proposito sono da riferire le strategie immunoterapiche nei modelli murini: l'induzione di una risposta immune contro la proteina tramite vaccinazione con DC trasfettate con RNA codificante telomerasi è stata descritta da Gilboa (Nair, Heiser et al. 2000; Thornburg, Boczkowski et al. 2000). A seguito dell'intervento vaccinale, gli animali risultavano parzialmente protetti dall'inoculo di linee tumorali telomerasi-positivo. Inoltre, assai interessante dal punto di vista clinico è stata l'osservazione che gli animali vaccinati risultavano sani e non sofferenti per l'insorgenza di patologie autoimmuni rivolte contro le cellule ematopoietiche o i tessuti normali esprimenti telomerasi (Nair, Heiser et al. 2000). Infatti, i linfonodi, le placche del Peyer, la milza, il timo ed il fegato degli animali vaccinati risultavano completamente normali ad un'indagine istologica, anche a distanza di un anno dalla vaccinazione; inoltre, i livelli di IgM e IgG risultavano sostanzialmente normali così come il numero di granulociti, linfociti, eritrociti e piastrine circolanti nel sangue. Questi risultati possono essere spiegati dal fatto che i livelli di attività di telomerasi nelle cellule esprimenti fisiologicamente la ribonucleoproteina risultano essere circa di 100 volte più bassi rispetto alle cellule tumorali, e questo implicherebbe un numero di complessi MHC/peptidi-TERT specifici presenti a livello di membrana plasmatica insufficienti nell'attivare una risposta immunitaria (Gross, Graff-Dubois et al. 2004). Queste osservazioni avvalorano il significato dell'antigene telomerasi come antigene tumorale in quanto la sua diversa espressione permetterebbe al sistema immune di discriminare tra tessuto normale e tessuto neoplastico. Altro motivo di interesse è il fatto che molteplici risultati scientifici suggeriscono che i peptidi derivanti dalla processazione fisiologica della proteina TERT da parte delle cellule tumorali, vengono presentati in associazione con le molecole MHC di classe I e sono riconosciuti come bersaglio da linfociti T (Vonderheide, Hahn et al. 1999). Oggigiorno sono stati descritti numerosi potenziali peptidi di telomerasi umana presentati da almeno cinque molecole HLA di classe I (A2, A1, A3, A24 e B7). Data la complessità del sistema HLA, la maggior parte dei trials sperimentali si sono focalizzati esclusivamente verso l'HLA-A2 essendo questo l'istotipo più frequente nella popolazione caucasica (Cortez-Gonzalez and Zanetti 2007). L'impiego di diverse tecniche per generare *ex vivo* CTL specifici anti-telomerasi da pazienti portatori di tumore dimostrano che la tolleranza centrale o periferica

verso quest'antigene non rappresenta un ostacolo importante per indurre l'espansione di linfociti T CD8⁺, anche se studi riguardanti l'affinità di queste cellule ad oggi non sono stati ancora condotti (Cortez-Gonzalez and Zanetti 2007). Interessanti risultano essere anche le osservazioni sul numero di linfociti T TERT-specifici circolanti: infatti, mentre negli individui sani il numero di CTL TERT-specifici è molto basso, nei pazienti oncologici sottoposti a terapie classiche sono stati trovati alti livelli di CD8⁺ TERT specifici (Filaci, Fravega et al. 2006). Inoltre, è stato riportato che i pazienti di portatori di certi tipi di tumore, come ad esempio l'epatocarcinoma, presentano nel siero alti livelli di anticorpi reattivi contro h-TERT (Masutomi, Kaneko et al. 2002). Sulla base di quest'intima relazione tra la presenza dell'antigene e l'instaurarsi di una risposta immunitaria, molti trials clinici di fase I di immunoterapia sono stati condotti in pazienti portatori di tumori avanzati. Anche se sono state utilizzate varie formulazioni di vaccini come DC caricate con peptidi (Vonderheide, Domchek et al. 2004), peptidi in associazione alla somministrazione di interleuchine (Mavroudis, Bolonakis et al. 2006), cellule B caricate con peptidi (Cortez-Gonzalez and Zanetti 2007) e DC transfettate con m-RNA codificante per TERT umano (h-TERT) (Su, Dannull et al. 2005), in vari contesti tumorali come carcinoma mammario (Vonderheide, Domchek et al. 2004), carcinoma prostatico (Su, Dannull et al. 2005; Cortez-Gonzalez and Zanetti 2007), melanoma (Parkhurst, Riley et al. 2004) e carcinoma pancreatico (Bernhardt, Gjertsen et al. 2006), nessuna risposta clinica oggettiva è stata ancora descritta. Tuttavia questi trials hanno prodotto dei dati interessanti; infatti è stata osservata l'espansione di linfociti T CD8⁺ TERT-specifici in 19 pazienti immunizzati tramite DC transfettate con l'm-RNA codificante h-TERT su 20 (Su, Dannull et al. 2005). Queste osservazioni, uniti agli studi sui modelli murini, piattaforma ideale per perfezionare protocolli vaccinali da poter traslare nell'uomo, rappresentano le basi per un ulteriore sviluppo di vaccini basati su h-TERT.

Il topo TRAMP: un modello di studio della carcinogenesi prostatica.

In campo oncologico, lo sviluppo di modelli murini in grado di mimare la patologia umana è di importanza fondamentale per caratterizzare gli stadi della progressione tumorale e la capacità del sistema immunitario di montare un'opportuna risposta antitumorale nonché per verificare l'efficacia di nuove

terapie. Storicamente, i primi studi compiuti sui modelli animali si riferiscono a sarcomi cutanei autoctoni indotti mediante irradiazione o esposizione a sostanze cancerogene, come il MCA. Altri modelli sono basati sul trapianto sottocute di linee cellulari neoplastiche di origine umana in topi nudi, in modo da mimare la crescita neoplastica, o in alternativa, l'impianto diretto del tumore nell'organo bersaglio. Questo modello ortotopico permette di ottenere risposte biologiche e terapeutiche più simili a quanto visto nei tumori umani. Anche se tutti questi modelli continuano ad esser utilizzati, rappresentando un'efficace opportunità per la ricerca ed un interessante banco di prova per sperimentare nuove terapie antitumorali, è innegabile che essi tuttavia presentano dei limiti intrinseci alla loro natura pseudofisiologica. I tumori trapiantabili inoltre, essendo indotti da cancerogeni chimici o fisici a dosi fortemente e acutamente genotossiche, esprimono antigeni che sebbene siano talora forti antigeni di rigetto non si trovano nella controparte neoplastica a genesi spontanea. Altro limite dei modelli di tumore trapiantabili risiede nel fatto che la neoplasia progredisce in un contesto tessutale non propriamente fisiologico, svincolato dal microambiente che si genera durante le fasi della progressione neoplastica. Infatti, i tumori spontanei d'origine epiteliale, come il carcinoma prostatico, sono composti da almeno due insiemi cellulari che interagiscono tra di loro: le cellule tumorali (componente parenchimale) e le cellule stromali con la matrice extracellulare (componente stromale). Le cellule normali nello stroma tumorale, quali le cellule endoteliali, i fibroblasti, i macrofagi e le mastcellule possono essere stimulate in maniera abnorme da numerosi fattori di crescita diffusibili, rilasciati dalle cellule tumorali, o possono direttamente produrre citochine e peptidi che, per effetto paracrino, stimolano la crescita tumorale. Risulta, quindi, evidente che le due componenti sono biologicamente attive e concorrono entrambe a creare un microambiente favorevole alla crescita e alla progressione della neoplasia, come è evidente nell'abnorme stimolazione della neovascolarizzazione indotta dal tumore e, cioè, lo sviluppo di nuovi vasi sanguigni che originano da vasi preesistenti del tessuto di origine. Tale processo, noto con il termine di neoangiogenesi è tipico della progressione tumorale al punto che nessun tumore può crescere oltre 1 mm^3 senza un adeguato supporto sanguigno. L'elevata cinetica replicativa delle neoplasie trapiantabili preclude, inoltre, la possibilità che si vengano a creare quei

fisiologici e complessi meccanismi di interazione tra il sistema immunitario dell'ospite e la neoplasia spontanea che possono fortemente influenzare l'esito di eventuali approcci immunoterapici.

In questo contesto si inserisce il modello trasgenico murino del carcinoma della prostata (TRAMP), ingegnerizzato tramite inserimento della sequenza dell'antigene T (Tag) di SV40 a valle del promotore del gene della probasina (PB) (Greenberg, DeMayo et al. 1995). L'espressione del gene PB, costituito da sette esoni e da sei introni, localizzato a livello del braccio lungo del cromosoma X (Xq22), è prostata-specifica, interessando i sei lobi della ghiandola, e coincide con la pubertà dell'animale. L'attivazione del promotore del gene PB determina conseguentemente la trascrizione e la traduzione della sequenza codificante l'oncoproteina Tag, promuovendo in questo modo l'inizio del processo neoplastico. La proteina Tag è in grado di interferire con la funzione di Rb e p53, due tra le principali proteine cellulari oncosoppressorie (Ludlow 1993). L'espressione del trasgene PB-Tag è riscontrabile attorno alla 4^a settimana d'età dell'animale, è regolata dagli androgeni ed è localizzata a livello delle cellule epiteliali della prostata, in particolare a livello dei lobi dorsolaterale e ventrale. Successivamente, attorno alla 12^a settimana d'età, il trasgene è espresso indistintamente da tutte le regioni della prostata e anche a livello delle vescicole seminali; in questo periodo, inoltre, i topi sviluppano mutazioni spontanee a livello dei recettori per gli androgeni determinando lo sviluppo di uno stato tumorale androgeno-indipendente, similmente a quanto accade nell'uomo. La penetranza di tale processo è completa e l'animale muore entro la 40^a settimana d'età.

Nel modello TRAMP la progressione della neoplasia verso una crescita indipendente dagli androgeni è stata ampiamente dimostrata dal fatto che se i topi vengono castrati alla 6^a settimana di vita solo il 50% di essi svilupperà una malattia androgeno-indipendente (Eng, Charles et al. 1999); al contrario, se la castrazione viene effettuata dopo la 12^a settimana d'età, la percentuale degli animali che svilupperanno uno stato patologico ormone-indipendente sale al 70-80% (Gingrich, Barrios et al. 1996). L'evoluzione della neoplasia in questo modello è caratterizzata da fasi ben distinte: il tumore esordisce sottoforma d'iperplasia intraepiteliale (PIN), per poi passare ad uno stato di carcinoma ben differenziato e culminare in un carcinoma poco differenziato. L'iperplasia

intraepiteliale è tipica degli animali di 8-10 settimane d'età ed è caratterizzata istologicamente da un epitelio a struttura cribrosa, con nuclei ipercromati e stratificati; a questa segue la fase d'iperplasia ben differenziata tipica di animali di 12 settimane, in cui si nota un elevato numero di mitosi ed eventi apoptotici. La fase d'iperplasia poco differenziata tipica degli animali di 24-30 settimane rappresenta la fase progredita della neoplasia ed è caratterizzata da lesioni necrotiche ed emorragiche (Figura 4).

La tendenza successiva della progressione è la metastatizzazione, sia ematica che linfatica, dapprima a livello dei distretti limitrofi alla sede prostatica, quali i linfonodi perirettali ed il collo della vescica, poi a livello del rene, del fegato, dei polmoni e delle ghiandole salivari. Negli animali castrati, l'incidenza della metastatizzazione risulta essere raddoppiata se paragonata agli animali non castrati. Questo evidenzia il fatto che le cellule metastatiche sono in grado di acquisire l'indipendenza androgenica mentre le lesioni primarie rimangono ormone-dipendenti (Greenberg, DeMayo et al. 1995). I topi TRAMP sono stati inoltre utilizzati come risorsa per sviluppare nuove linee tumorali, che hanno avuto un ruolo importante per gli studi *in vitro*. Sono state, infatti, isolate dalla prostata tumorale del topo tre linee stabilizzate (C1, C2, C3) che mantengono l'espressione di molecole di superficie tipiche dell'epitelio prostatico tumorale e dispongono di attività tumorigenica, eccetto la linea C3, se inoculate in animali singenici al topo TRAMP (Foster, Gingrich et al. 1997).

I carcinomi prostatici TRAMP, quanto le linee derivate (Yang, Holt et al. 2001), esprimono alcuni antigeni prostata-associati (PAA) tra cui Prostate Stem Cell Antigen (PSCA), Six Transmembrane Epithelial Antigen of Prostate (STEAP) e Prostate Specific Membrane Antigen (PSMA), che presentano elevata omologia con le rispettive isoforme umane. Il gene codificante l'antigene PSCA mappa nell'uomo a livello del cromosoma 8 (8q.24.2) mentre nel topo a livello del cromosoma 5, codifica per una proteina altamente glicosilata ancorata alla superficie delle cellule stromali della prostata tramite il meccanismo del glicosilfosfatidilinositolo (GPI). L'omologia tra l'isoforma umana con quella murina è dell'65%. Entrambe le proteine sono soggette ad internalizzazione, a processazione e presentazione via complesso MHC di classe I (Reiter, Gu et al. 1998). Il gene codificante l'antigene STEAP è localizzato nell'uomo a livello del

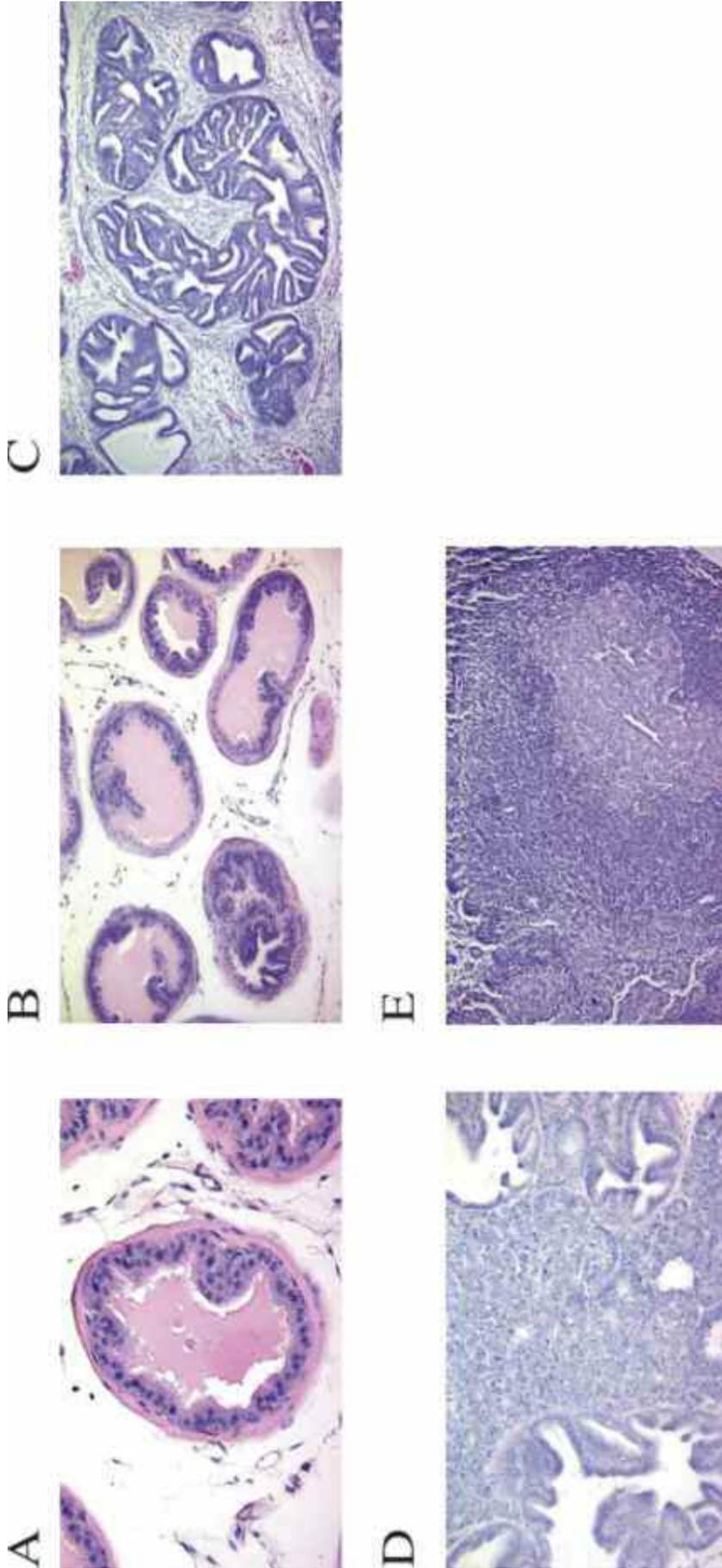


Fig. 4: Indagine istologica del tessuto prostatico di topi TRAMP a vari stadi di malattia. A) prostata normale. B) neoplasia intraepiteliale. C) carcinoma ben differenziato. D) carcinoma moderatamente differenziato. E) carcinoma scarsamente differenziato. (Figura modificata da originale presente nel sito: www.GreenbergLab.fhcr.org)

cromosoma 7 (7p22.3) mentre nel topo mappa a livello del cromosoma 5, codifica per una proteina transmembrana “a sei passi” che sottende la funzione di canale di membrana; in questo caso l’omologia delle due isoforme è del 80% (Hubert, Vivanco et al. 1999). La mappatura genetica del PSMA nell’uomo ha rilevato la presenza di due geni: uno è localizzato nella regione 11p11 e codifica per il trascritto espresso a livello della prostata, l’altro mappa a livello della regione 11q14 ma la sua espressione non è prostata specifica. Nel topo, il gene codificante l’antigene PSMA mappa in un unico locus ovvero a livello del cromosoma 7. Entrambe le due isoforme, murina che umana, con omologia del 86% codificano per una glicoproteina di membrana di tipo II costituita da 750 amminoacidi che similmente alla proteina PSCA è soggetta ad internalizzazione e processamento via complesso MHC di classe I (Bacich, Pinto et al. 2001). Gli mRNA specifici per le isoforme murine e umane di PSCA e STEAP hanno una distribuzione tissutale limitata al tessuto prostatico e risultano iperespressi nei tumori prostatici primari e nelle metastasi dei topi TRAMP.

Similmente il PSMA, nonostante una distribuzione tissutale più ampia nel topo, risulta up-regolato nei tessuti neoplastici TRAMP.

Da quanto descritto è evidente che questo modello riveste un ruolo fondamentale nella ricerca biomedica sul carcinoma prostatico, avendo delle peculiarità fondamentali che possiamo riassumere in due punti:

1. L’evoluzione neoplastica da carcinoma *in situ* a tumore francamente invasivo è simile a quanto accade nell’uomo; questo permette di disporre delle diverse fasi della progressione neoplastica per disegnare protocolli sperimentali volti alla prevenzione o alla terapia del tumore, caratteristica questa che rende potenzialmente traslabile alla clinica eventuali approcci terapeutici.
2. La condivisione di antigeni prostata associati (PAA) con elevata omologia con le isoforma umane; questo permette di predisporre un reagentario che, qualora dimostratosi efficace in modelli murini preclinici, potrebbe esser impiegabile nella terapia della neoplasia umana, come dimostra il recente impiego di anticorpi anti-PSMA che è stato in grado di indurre la regressione infartuale di carcinomi prostatici umani impiantati in topi nudi (Huang, Bennett et al. 2004).

Questo modello, tuttavia, presenta anche dei limiti, il più importante dei quali è rappresentato da una variabilità fenotipica nella progressione della neoplasia che risulta potenzialmente limitante nella valutazione di un trial sperimentale. Questa variabilità è legata al background genetico degli animali e conferma l'ipotesi di specifiche alterazioni di uno o più geni che sopraggiungono durante lo sviluppo della neoplasia. L'importanza del background genetico di partenza nell'indirizzare lo sviluppo della neoplasia verso un determinato pattern di crescita è ampiamente dimostrato in letteratura; infatti, i tumori TRAMP di background C57BL/6 risultano essere di natura propriamente infiltrante invadendo con alta frequenza l'uretra e le vescicole seminali; al contrario le masse tumorali sviluppate dai topi F1 derivati dall'incrocio (C57BL/6 TRAMP x FVB) sono maggiormente localizzate ed altamente vascolarizzate (Kaplan-Lefko, Chen et al. 2003). Ad una diversa progressione della malattia del carcinoma TRAMP si associano caratteristiche peculiari che si discostano in parte dalla medesima patologia nell'uomo. Infatti, il tumore TRAMP presenta una percentuale maggiore di fenotipo filloide, rispetto a quanto ravvisabile nell'uomo, ovvero una commistione tra un tumore di natura connettivale e uno di natura epiteliale. Questa doppia natura del tumore TRAMP può portare a degli esiti di patologia che non sono riferibili alla neoplasia umana. Nella stessa ottica, il tumore TRAMP presenta una maggior percentuale di fenotipo neuroendocrino rispetto al carcinoma prostatico umano. L'insorgenza del fenotipo neuroendocrino è un evento tuttavia stocastico, dovuto all'acquisizione da parte delle cellule epiteliali, in seguito alla trasformazione neoplastica, di capacità secretorie tipiche delle cellule neuroendocrine (Kaplan-Lefko, Chen et al. 2003).

Queste ultime osservazioni, se pur ridimensionano, non cancellano certo l'importanza del modello come piattaforma ideale per caratterizzare il ruolo del sistema immunitario nella progressione del tumore della prostata e nella messa a punto di appropriate strategie terapeutiche anti-tumorali.

SCOPO DELLA TESI

La definizione molecolare degli antigeni tumore-associati riconosciuti dai linfociti T e la conoscenza dei meccanismi che regolano l'attivazione linfocitaria e dei meccanismi di escape tumorale hanno consentito negli ultimi anni la messa a punto, in modelli neoplastici sperimentali, di più efficaci strategie vaccinali, che mirano ad interferire con la tolleranza immunologica e ad attivare in modo specifico i meccanismi effettori dell'immunità adattativa, con lo scopo di generare una risposta immune tumore-specifica, protettiva e di lunga durata.

Nell'ambito dell'immunoterapia antitumorale due sono le strade potenzialmente perseguibili: la prima è la vaccinoterapia (detta anche immunoterapia attiva), la seconda è l'immunoterapia cellulare adottiva (o immunoterapia passiva).

Gli interventi di vaccinoterapia mirano ad educare il sistema immunitario del paziente a riconoscere antigeni tumori-associati (TAA) presenti nelle cellule tumorali con lo scopo di arrivare a contrastare la crescita tumorale attraverso la selezione e l'espansione delle cellule effettrici proprie dell'individuo (Lollini, Cavallo et al. 2006). Ad oggi un numero consistente di vaccini antitumorali sono stati utilizzati in clinica: vaccini basati sulle stesse cellule tumorali irradiate, su cellule dendritiche transfettate o infettate con l'antigene di interesse o sull'inoculo della proteina o del peptide antigenico (Mocellin, Mandruzzato et al. 2004). Una menzione particolare va fatta per i vaccini a DNA, che rappresentano una frontiera emergente vista l'ampia mole di dati ottenuti in ambito preclinico (Cohen 2001). Sebbene i nuovi vaccini anti-tumorali mostrino un'aumentata efficacia nei confronti di tumori di piccole dimensioni in modelli preclinici, l'immunoterapia attiva è generalmente inefficace come singolo provvedimento terapeutico una volta che la neoplasia raggiunge dimensioni consistenti o diviene metastatica. Come è facile intuire, i limiti di questo approccio sono molteplici e recenti meta-analisi di protocolli clinici antitumorali basati su diverse formulazioni di vaccini hanno rivelato che, sebbene sia possibile indurre una risposta immunitaria verso antigeni tumorali nella maggior parte dei soggetti vaccinati, le risposte cliniche oggettive sono piuttosto limitate e si verificano in meno del 10% dei pazienti trattati (Choudhury, Mosolits et al. 2006). La tolleranza ad antigeni tumorali *self* e l'attiva immunosoppressione mediata da cellule mieloidi (Bronte and Zanovello 2005) e/o linfoidi (Colombo and Piconese 2007) sono solo alcune delle cause in grado di spiegare questa modesta efficacia terapeutica.

A differenza della vaccinoterapia, l'immunoterapia cellulare adottiva consegue il trasferimento, in un organismo ospite, di cellule immunitarie con lo scopo di introdurre nuove funzioni o di correggere quelle difettive (Gattinoni, Powell et al. 2006). L'entusiasmo riposto in questo approccio deriva dalla possibilità di manipolare, *ex vivo*, vie biologiche cellulari e molecolari in un modo che non sarebbe altrimenti possibile nell'ospite intatto. Linfociti T infiltranti il tumore (TIL) possono essere coltivati *in vitro*, espansi e sottoposti a selezione per generare linfociti con elevata avidità di riconoscimento dell'antigene tumorale ed essere reinfusi nel paziente donatore, in un contesto completamente autologo (Kawakami, Nishimura et al. 1993). Per incrementare l'efficacia terapeutica del trasferimento cellulare adottivo, pazienti con melanoma sono stati trattati tramite radioterapia o somministrazione di farmaci quali Fludarabina o Ciclofosfamide, allo scopo di indurre una parziale mielo-linfo-deplezione prima del trasferimento adottivo dei TIL. Qualunque sia il meccanismo d'azione, la linfo-deplezione ha consentito di ottenere risposte cliniche oggettive in circa il 50% dei pazienti con melanoma metastatico (Muranski, Boni et al. 2006).

La scelta dell'antigene verso cui mirare la strategia immunoterapeutica allo scopo di generare o ristabilire una risposta immunitaria specifica rappresenta un aspetto di primaria importanza nell'intraprendere un qualsiasi percorso immunoterapico.

La ribonucleoproteina nucleare telomerasi (TERT), la cui funzione è mantenere l'integrità delle porzioni terminali dei cromosomi durante la duplicazione del DNA, è normalmente inattiva nella maggior parte delle cellule somatiche, ma può riattivarsi in molti tipi di neoplasie favorendo il processo di immortalizzazione cellulare e, conseguentemente, la natura invasiva del tumore (Zakian 1997). TERT, infatti, è espressa in circa l'85% delle cellule tumorali, indipendentemente dalla loro origine o istologia, e risulta essere pertanto un importante antigene tumorale universale.

Su queste premesse si basa questo lavoro, il cui scopo è stato valutare l'impatto terapeutico di interventi sia di immunoterapia attiva che passiva, in contesti di tumorigenesi murina indotta e spontanea, sfruttando l'antigene TERT.

L'efficacia della strategia di immunoterapia cellulare adottiva ha richiesto una caratterizzazione funzionale *in vitro* dei linfociti T citotossici selezionati ed espansi dall'intervento vaccinale e una successiva verifica della loro capacità terapeutica, una volta trasferiti in animali portatori di tumore, nel contrastare la

progressione della neoplasia. Analogamente, l'efficacia dell'intervento vaccinale è stato valutato come effettiva protezione dell'animale contro la progressione della neoplasia, in termini d'aumento della sopravvivenza degli animali trattati con vaccini a DNA rispetto ad animali trattati con adeguati controlli negativi.

MATERIALI & METODI

TOPI

Sono stati utilizzati topi maschi transgenici **TRAMP** di background C57BL/6 di aplotipo H-2^b derivati da una coppia originaria del “ Greenberg Lab” (Fred Hutchison Cancer Research Center, Seattle, U.S.A). Attualmente disponiamo di una colonia in omozigosi e di una colonia in eterozigosi in background C57BL/6. I maschi positivi per l’espressione del trasgene PB-Tag vengono utilizzati nei setting sperimentali all’età di sei settimane. Sono stati impiegati anche maschi **C57BL/6J** di aplotipo H-2^b e maschi del ceppo **Balb/c** di aplotipo H-2^d di età compresa tra le otto e le dodici settimane della ditta Charles River Italia S.p.A. (Calco, Como, Italia). I topi sono stati mantenuti in gabbie di plastica, a temperatura costante e dieta bilanciata nello stabulario del Dipartimento di Scienze Oncologiche e Chirurgiche, Sezione di Oncologia, dell’Università di Padova. Tutti gli esperimenti eseguiti sugli animali si sono attenuti alle linee guida indicate dalle direttive nazionali ed internazionali (Workman, Balmain et al. 1988)

Screening topi TRAMP

La presenza del trasgene PB-Tag viene valutata tramite PCR da DNA estratto da PBL. Gli animali vengono preliminarmente anestetizzati per inalazione di etere, successivamente tramite pasteur di vetro viene prelevato un piccolo quantitativo di sangue a livello dell’occhio. Per l’estrazione del DNA è stato utilizzato il kit “puregene DNA isolation kit” (Gentra system, Germania) ed il suo protocollo specifico. Il DNA ottenuto è stato utilizzato come template per una reazione di PCR condotta utilizzando il thermal cycler PTC-200 peltier (MY Research Waltham, MA, U.S.A.) che prevedeva 35 cicli di amplificazione (94°C 4 minuti, 94°C 1 minuto 45°C 15 secondi, 72°C 1 minuto) seguiti da un’estensione finale a 72°C per 5 minuti.

La reazione consta di una mix costituita da 30 µl di c-DNA, 5 µl di buffer 10X (Applied Biosystems, CA, U.S.A.) 6 µl MgCl₂ 25mM (Applied Biosystems, CA, U.S.A.), 1 µl di dNTPs 10mM (Invitrogen, Carlsbad, CA, U.S.A.), 2.5 µl alla concentrazione finale di 1µM dei primers specifici per il trasgene (PB-1F: 5'-CCG GTC GAC CGG AAG CTT CCA CAA GTG CAT T-3'; TagR: 5'-CTC

CTT TCA AGA CCT AGA AGG TCC A-3'), 2.5 µl alla concentrazione finale di 1 µM dei primers specifici per la β-caseina di topo (M β-caseinaR: 5'-AGA AAC GGA ATG TTG TGG AGT-3'; M β-caseinaF: 5'-GAT GTG CTC CAG GCT AAA GTT -3'), 0.5 µl Taq-DNA polymerase (Invitrogen, Carlsbad, CA, U.S.A.) e 2,5 µl di H₂O per iniettabili.

Ultimata la reazione i campioni vengono fatti correre in un gel d'agarosio all'1% contenete 0.5 µg/ml di Etidio Bromuro (EtBr), assieme ad un marcatore molecolare (1Kb Marker, MB). Le bande attese sono rispettivamente a 0,6 Kb per il PB-Tag e a 0,5 Kb per la β-caseina.

TERRENI DI COLTURA

Colture cellulari

DMEM 10%: DMEM (Invitrogen, Carlsbad, CA, U.S.A.), 2 mM di L-glutammina, 10 mM di HEPES, 150 U/ml di streptomicina, 200 U/ml di penicillina, 20 µM di 2-β-mercaptoetanolo (2β-Me) (Sigma-Aldrich, St.Louis, MO, U.S.A.) e 10% di siero bovino fetale (FBS, Invitrogen, CA, U.S.A.) inattivato a 56°C per 30'.

DMEM 10% con rIL-2: DMEM (Invitrogen, Carlsbad, CA, U.S.A.), 2 mM di L-glutammina, 10 mM di HEPES, 150 U/ml di streptomicina, 200 U/ml di penicillina, 20 µM di 2-β-mercaptoetanolo (2β-Me) (Sigma-Aldrich, St.Louis, MO, U.S.A.) e 10% di siero bovino fetale (FBS, Invitrogen, CA, U.S.A.) inattivato a 56°C per 30' ,addizionato con 20 U/ml di rIL-2 (Euro Cetus-Chiron, Milano, Italia).

TRAMP 10%: DMEM (Invitrogen, Carlsbad, CA, U.S.A.) supplementato con 2mM di L-glutammina, 10mM di HEPES, 20µM di 2-β-mercaptoetanolo (2β-Me) (Sigma-Aldrich, St.Louis, MO, U.S.A.), 150U/ml di streptomicina, 200 U/ml di penicillina e 5% siero bovino fetale (FBS, Invitrogen, CA, U.S.A.) inattivato al calore (56° per 30'), 5% NuSerum (Collaborative Biomedical Products, Bedford, MA, U.S.A.), 5 µg/ml di Insulina (Sigma Chemical, St.Louis, Co, U.S.A.) e 0.01 nM di diidrotosterone (Sigma-Aldrich, St.Louis, MO, U.S.A.).

Colture utilizzate per i saggi

DMEM 10%: DMEM (Invitrogen, Carlsbad, CA, U.S.A.), 2 mM di L-glutamina, 10 mM di HEPES, 150 U/ml di streptomina, 200 U/ml di penicillina, 20 µM di 2β-Me (Sigma-Aldrich, St.Louis, MO, U.S.A.) e 10% di siero fetale bovino (FBS, Invitrogen, CA, U.S.A.) inattivato al calore.

RMPI 5%: RPMI 1640 (Euroclone, Milano, Italia), 2 mM di L-glutamina, 1 mM di sodio piruvato, 150 U/ml di streptomina, 200 U/ml di penicillina, 20 µM di 2β-Me Sigma-Aldrich, St.Louis, MO, U.S.A.) e 5% di siero fetale bovino (FBS, Invitrogen, CA, U.S.A.) inattivato al calore.

RPMI 3%: RPMI 1640 (Euroclone, Milano, Italia), 2 mM di L-glutamina, 1 mM di sodio piruvato, 150 U/ml di streptomina, 200 U/ml di penicillina e 3% di siero fetale bovino (FBS, Invitrogen, CA, U.S.A.) inattivato al calore.

LINEE CELLULARI

MBL-2 (aplotipo H-2^b), linfoma indotto da virus leucemogeno murino di Moloney (M-MuLV), mantenuto attraverso passaggi settimanali intraperitoneo in topi singenici C57BL/6. Tale linea è stata mantenuta in coltura con DMEM 10%.

CT26 (aplotipo H-2^d), linea di coloncarcinoma indifferenziato indotto mediante carcinogenesi chimica, stabilizzata dopo espanto da un topo Balb/c. Tale linea è stata mantenuta in coltura DMEM 10%.

C1 (aplotipo H-2^b), linea tumorale prostatica derivata dal topo TRAMP. Tale linea è stata mantenuta in coltura con il terreno TRAMP

C2 (aplotipo H-2^b), linea tumorale prostatica derivata dal topo TRAMP. Tale linea è stata mantenuta in coltura con il terreno TRAMP

C1-B71 (aplotipo H-2^b), linea tumorale prostatica derivante dal topo TRAMP transfettata stabilmente per l'espressione della molecola costimolatrice B71. Tale linea è stata mantenuta in coltura con terreno TRAMP addizionato con l'antibiotico geneticina (G418, GIBCO) alla concentrazione di 1mg/ml che consente di selezionare la popolazione transfettata.

C2-B71 (aplotipo H-2^b), linea tumorale prostatica derivante dal topo TRAMP transfettata stabilmente per l'espressione della molecola costimolatrice B71. Tale linea è stata mantenuta in coltura con terreno TRAMP addizionato con

l'antibiotico geneticina (G418, GIBCO) alla concentrazione di 1mg/ml che consente di selezionare la popolazione transfettata.

MCA 203 (aplotipo H-2^b), linea cellulare di fibrosarcoma. Tale linea è stata mantenuta in coltura con DMEM 10%.

MC 38 (aplotipo H-2^b), linea di colon carcinoma. Tale linea è stata mantenuta in coltura con DMEM 10%.

EL-4 (aplotipo H-2^b), linea di timoma. Tale linea è stata mantenuta in coltura con DMEM 10%.

B16Lu8 (aplotipo H-2^b), linea di melanoma murino che metastatizza a livello polmonare ci è stata fornita dal Dr. James C. Yang (Surgery Branch, National Institute of Health, Bethesda, MD). Tale linea è stata mantenuta in coltura con DMEM 10%.

B16447 (aplotipo H-2^b), riferita come B16, linea cellulare di melanoma murino, ci è stata fornita dal Dr. I. J. Fidler (Cancer Center, Houston, TX). Tale linea è stata mantenuta in coltura con DMEM 10%.

B16-B71 (aplotipo H-2^b), linea cellulare di melanoma murino transfettata stabilmente per l'espressione della molecola costimolatrice B71, gentilmente fornitaci dal Dr. P. Dalla Bona (Istituto Nazionale Tumori, Milano, Italia). Tale linea è stata mantenuta in coltura con DMEM 10% addizionato con l'antibiotico geneticina (G418, GIBCO) alla concentrazione di 1 mg/ml.

clone 16.1 specifico per l'antigene β -gal: è stato ottenuto dal nostro laboratorio da topi C57BL/6J immunizzati con il vettore plasmidico pCMV- β -gal, attraverso ripetute stimolazioni in vitro con splenociti singenici γ -irradiati e pulsati con il peptide β -gal₉₆₋₁₀₃ (10 μ mol/L) e dopo clonaggio tramite diluizione limite. Tale CTL viene mantenuto in coltura con il terreno DMEM 10% addizionato con rIL-2.

PEPTIDI

Il peptide m-TERT₁₉₈₋₂₀₅ (VGRNFTNL) ristretto per aplotipo H-2^b, è stato identificato dal gruppo della Dr.ssa Elisa Scarselli dell'Istituto di Ricerca di Biologia Molecolare (IRBM) di Pomezia, tramite screening di un pannello completo di peptidi che coprivano l'intera sequenza di Telomerasi e successiva analisi bioinformatica utilizzando gli algoritmi predittivi BIMAS e SYFPEITHI. Tale peptide è stato sintetizzato dalla ditta JPT (Berlino, Germania). Il peptide β -

gal₉₆₋₁₀₃ (DAPIYTNV) della proteina β -galattosidasi è stato sintetizzato dalla Technogen (Napoli, Italia).

I peptidi presentavano all'analisi mediante HPLC una purezza maggiore del 95%. Il peptide liofilizzato è stato risospeso in DMSO (Sigma-Aldrich, St.Louis, MO, U.S.A.) e stoccato a -80°C fino al momento dell'uso.

ALLESTIMENTO DI COLTURE LEUCOCITARIE

Allestimento di Colture Leucocitarie Miste (MLC)

Le milze di topi maschi Balb/c (aplotipo H-2^d) di 8-12 settimane di età, e le milze di topi C57BL/6 e TRAMP (aplotipo H-2^b) sono state prelevate sterilmente e disgregate meccanicamente. Si è poi proceduto alla lisi dei globuli rossi utilizzando 4 ml di Lysing Buffer (ACK BioWhittaker Walkersville, MD, U.S.A.) per 3-4 minuti. Dopo il lavaggio la sospensione cellulare così ottenuta è stata passata attraverso una garza di nylon per eliminare possibili aggregati cellulari. Le sospensioni cellulari così ottenute sono state utilizzate per allestire le MLC. In piastre da 24 pozzetti (Falcon, Becton Dickinson, NJ, U.S.A.) sono stati coltivati 3×10^6 splenociti Balb/c γ -irradiati e un ugual numero di splenociti C57BL/6 o TRAMP in un volume finale di 1 ml di terreno DMEM 10% per pozzetto.

Allestimento delle colture leucocitarie stimulate da peptide (MLPC)

Le milze di topi TRAMP e C57BL/6 (aplotipo H-2^b) sono state asportate sterilmente e tramite disgregazione meccanica è stata ottenuta una sospensione cellulare priva di aggregati una volta passata su una garza di nylon. La sospensione cellulare è stata utilizzata per allestire MLPC. In piastre da 24 (Falcon, Becton Dickinson, NJ, U.S.A.) 5×10^6 splenociti TRAMP e/o C57BL/6 sono stati posti in coltura con terreno DMEM 10% addizionato con il peptide di interesse alla concentrazione finale di 1 μ M. Le colture così allestite sono state incubate per 5 giorni a 37°C in atmosfera satura di vapore acqueo e contenente il 5% di CO₂.

ANALISI CITOFUORIMETRICA

0.5×10^6 splenociti derivanti dall'MLPC sono stati risospesi in 50 μ l di FACS buffer (0.9% NaCl, 2% BSA e 0.02% NaN₃, (Sigma-Aldrich, St.Louis, MO, U.S.A.)) a cui è stato aggiunto un anticorpo anti-mouse Fc- γ receptor (clone 2.4G2, ATCC HB-197) per ridurre i siti aspecifici, tale sospensione cellulare è stata quindi incubata per 10 minuti a temperatura ambiente. E' stato di seguito aggiunto il tetramero specifico per m-TERT coniugato con ficoeritrina alla concentrazione di 5 μ g/ml (Beckman Coulter, UK), o il tetramero specifico per TRP-2 (sintetizzato nel nostro laboratorio) coniugato con ficoeritrina alla concentrazione di 5 μ g/ml. Successivamente è stato effettuato un lavaggio in PBS a cui è seguita marcatura con CD8 Tricolor (0,1 μ g/ 10^6 cellule, clone CTCD8 α Caltag, Burlingame, CA, U.S.A.) e CD3 FITC (0,1 μ g/ 10^6 cellule, clone 145-2C11; Caltag, Burlingame, CA, U.S.A.) in 50 μ l di FACS buffer per 30 min a +4°C. Dopo il lavaggio il campione è stato risospeso in 200 μ l di PBS 1X e analizzato con il citofluorimetro FACSCalibur (BD Biosciences, Mountain View, CA, U.S.A.). I dati sono stati analizzati usando il software Cell Quest (BD Biosciences, Mountain View, CA, U.S.A.).

SAGGI FUNZIONALI

Test ELISPOT (Enzyme-Linked Immunonoassobent Spots Assays)

Il saggio è stato eseguito usando il KIT per la rilevazione di IFN- γ murino (BD Pharmingen, Mountain View, CA, U.S.A.) seguendo le istruzioni allegate, utilizzando le piastre MULTIscreen HTS (Millipore, NJ, U.S.A.). Il numero di spots è stato valutato il lettore di piastre KS e il relativo softwar.

Test E.L.I.S.A. (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay)

Il surnatante delle coculture MLPC con bersagli cellulari allogeneici/singeneici, piastrati per 24 ore a 37°C in piastre da 96 pozzetti a fondo a U (Falcon, Becton Dickinson, NJ, U.S.A.), è stato analizzato mediante test E.L.I.S.A per rilascio di IFN- γ (Endogen, Rockford, U.S.A.).

Il giorno precedente al test, la piastra da 96 pozzetti appositata (NUNC-Immuno 96 microwell-plate, NUNC, Danimarca) è stata incubata overnight, a temperatura

ambiente, con 100 µl anticorpo di coating per la citochina in esame, diluito in PBS 1X.

Il giorno del test la piastra è stata incubata per un'ora con *assay buffer* (PBS BSA 2 %, pH 7.2-7.4), per saturare i siti di legame aspecifici.

La piastra è stata in seguito lavata per tre volte con 200 µl/pozzetto di *wash buffer* (50mM Tris, 0.2% Tween 20; pH 7.0-7.5), per rimuovere l'anticorpo in eccesso. Dopo il terzo lavaggio, ad ogni pozzetto sono stati aggiunti 50 µl di *assay buffer* e 50 µl di surnatante di coltura dei campioni. In alcuni pozzetti, al posto del campione, all'*assay buffer* sono stati aggiunti 50 µl di standard del kit, partendo dalla concentrazione di 17500 pg/ml e con diluizioni scalari 1:2 in terreno RPMI 10 % con 2βMe, per poter costruire una retta di taratura delle concentrazioni di citochina in esame. Sia i campioni che gli standard sono stati allestiti in doppiette. La piastra è stata tenuta in incubazione overnight a temperatura ambiente. Sono stati eseguiti tre lavaggi con *wash buffer* e la piastra è stata incubata per un'ora a temperatura ambiente con 100 µl di anticorpo biotinilato di detecting, diluito in *assay buffer*. Dopo tre lavaggi in *wash buffer*, la piastra è stata incubata per 30 minuti, a temperatura ambiente, con 100 µl di streptavidina legata a perossidasi (poly-HRP-Streptavidina Endogen, a 1 mg/ml) diluita 1:6000 in *assay buffer*. Sono stati quindi eseguiti altri tre lavaggi in *wash buffer* e sono stati aggiunti 200 µl/pozzetto di substrato OPD (*o*-Phenylenediamine Dihydrochloride Peroxidase) (Sigma Fast, OPD Peroxidase Substrate tablet set), diluito in acqua distillata. La piastra è stata tenuta al buio. Lo sviluppo della piastra è stato bloccato mediante l'aggiunta di 50 µl di HCl 3 N. La piastra è stata poi analizzata mediante Spectra Count Packard con lettura a 490 nm.

Valutazione della risposta citotossica tramite saggio di rilascio di ⁵¹Cr

L'attività litica delle MLC e delle MLPC è stata valutata mediante un saggio citotossicità a breve termine di incubazione, utilizzando la linea MBL-2 pulsata con i due peptidi correlato/scorrelato (5-10x10⁶ di cellule/ml di terreno DMEM 10% con 5 µg/ml di peptide), o linee allogeniche/ singeniche non pulsate.

Tali cellule (1x10⁶) sono state marcate, in pellet, con 100 µCi Na₂ ⁵¹CrO₄ (DuPont, Boston, MA, U.S.A.) per 1 h a 37 °C. Al termine della marcatura le cellule sono state opportunamente lavate e quindi risospese in terreno RPMI 5%, alla concentrazione di 2x10⁴/ml; 100µl di tale sospensione cellulare sono stati

seminati in una micropiastre da 96 pozzetti con fondo a U (Bibby Sterlin Ltd, Stone, U.K.) in presenza di diluizioni scalari di cellule effettrici, distribuite anch'esse in 100µl ed in triplicato. Le micropiastre sono state centrifugate per 5 minuti a 200xg ed incubate a 37 °C per 5 h. Infine da ogni pozzetto sono stati prelevati 30µl di surnatante e trasferiti in micropiastre contenenti uno scintillante solido (Packard Instrument Co, Meriden, CT, U.S.A.).

Dopo aver lasciato seccare le piastre, la radioattività emessa è stata misurata con un contatore di scintillazione γ per piastre (Top Count, Packard Instruments Co, Meriden, CT, U.S.A.). La percentuale di lisi specifica è stata calcolata da campioni allestiti in triplicato utilizzando la seguente formula:

$$\% \text{ di rilascio specifico} = 100 \times \frac{(R_{sper} - R_{spon})}{(R_{Max} - R_{spon})}$$

nella quale:

- R_{spon} . in cpm = rilascio spontaneo, quantità d'isotopo rilasciato dalle cellule bersaglio incubate in assenza di effettori.
- R_{max} . in cpm = rilascio massimo di radioattività ottenuto dopo ripetute operazioni di scongelamento delle cellule radiomarcate. Il trattamento causa la completa rottura della membrana citoplasmatica.
- R_{sper} in cpm = rilascio sperimentale misurato per ciascun rapporto tra effettore/bersaglio.

COSTRUTTI PLASMIDICI

Il cDNA codificante per mouse TERT (*m-TERT*) ci è stato fornito dalla Geron Corporation (Manlo, CA, U.S.A.), inserito in pBluescript ed infine clonato in pcDNA3 (Invitrogen, Carlsbad, CA, U.S.A.) tramite doppio taglio con *EcoRI* e *XhoI*. Ottenendo così il plasmide pcDNA3-m-TERT..

Successivamente la regione di interesse è stata isolata dal frammento contenente il gene non rilevante tramite restrizione con *NotI* e *HindIII*, quindi è stata purificata dopo estrazione da gel d'agarosio e trasferita in VR1055 (in seguito riferito come VICAL) (Vical Inc., San Diego, CA, USA), plasmide ottimizzato per il clonaggio rapido e per l'espressione in vivo, precedentemente linearizzato con la medesima reazione di restrizione. Si è ottenuto in questo modo il plasmide **VICAL-m-TERT**.

Il costrutto **pVIJnsA-m-TERT** è stato ottenuto dall'inserimento di un frammento sintetico corrispondente alla sequenza ottimizzata dei codoni TPA-m-TERT-LTB ottenuta dalla GENEART (Geneart GmbH, Resensburg, Germania), tramite clonaggio dei siti *Bgl*III e *Sal*I del vettore pVIJnsA (Montgomery, Shiver et al. 1993).

Il costrutto **pCMV-β-gal** è stato ottenuto tramite isolamento del gene β-gal di *E.coli* dal vettore plasmidico pC4AUGβ-gal, che ci è stato fornito dal Dr. Macgregor, tramite restrizione con *Eco*RI-*Xba*I. Quidi subclonato nel vettore pUC19 e infine clonato nel vettore pCMV (Addgene, MA, U.S.A.) tramite restrizione con *Not*I.

La corretta orientazione dell'inserito è stata valutata attraverso un'analisi di restrizione. Infine l'amplificazione del costrutto è stata eseguita con "Endofree plasmid mega kit" (Qiagen GmbH Hilden, Germania) seguendo il specifico protocollo.

ANALISI SPECTRATYPING E CLONOTIPICA DEL TCR

L'estrazione dell'RNA è stata realizzata con TRIZOL™ (Gibco, CA, USA), il quale permette l'isolamento da cellule e da tessuti dell'RNA totale, preservandolo da contaminazioni da RNasi. La concentrazione dell'acido nucleico ottenuto è stata valutata tramite spettrofotometro DU 530 Beckman usando come ratio il rapporto 260/280 nm, e quindi portata a 0.5mg/ml. L'integrità dell'RNA è stata valutata tramite corsa elettroforetica in gel all'1% d'agarosio per la presenza delle due bande ribosomiali. Si è proceduto quindi alla reazione di retrotrascrizione e successiva amplificazione dei geni specifici per il TCR, tramite PCR (Polymerase chain reaction). Dopo l'amplificazione si è proceduto alla valutazione della lunghezza della regione CDR3 del TCR tramite la tecnica dello Spectratyping. Brevemente, un ugual volume del templatato di PCR viene combinato con un volume di *dye-loading buffer* e 0.2 µl di Rox-marker (Applied Biosystems, CA, U.S.A.), quindi la reazione viene incubata a 94°C per 2 minuti e fatta correre in un gel fluorescente di sequenziamento ed analizzata tramite software Genescan (Applied Biosystems, CA, U.S.A.). L'analisi clonotipica del TCR è stata effettuata tramite l'utilizzo di un protocollo già riportato in letteratura (De Palma, Marigo et al. 2004).

VIRUS

I costrutti adenovirali utilizzati sono stati ottenuti tramite ricombinazione Cre-lox; espansi utilizzando la linea cellulare 293, purificati tramite gradiente di densità di cesio e infine dializzati utilizzando protocolli standard. I vettori adenovirali utilizzati esprimono unicamente la sequenza genica di interesse, inserita sotto il promotore del citomegalovirus presente nel vettore. I virus vengono stoccati a -80° gradi fino al momento dell'utilizzo.

VACCINAZIONE A DNA PLASMIDICO

Gli animali vengono preliminarmente anestetizzati prima di ciascuna procedura vaccinale che preveda l'elettroporazione del muscolo. La miscela di anestesia consta di un farmaco ad effetto sedativo e miorilassante (Rompum, BAYER, Germania) associato ad un analgesico morfino-simile (KETAVET, Farmaceutici Gellini S.p.A., Italia). 1,75 mg/5ml di Rompum e 0,06 mg/5ml di Ketavet vengono miscelati in soluzione fisiologica e di tale miscela viene inoculato un volume pari a 0,1 ml/10 grammi di peso del topo.

Gli animali sono stati quindi immunizzati tramite inoculo di 100 µl di una miscela costituita da: 50 µg di DNA e 600 µg di acido poli L-glutammico (Sigma, Chemical, St.Louis, Co, USA) miscelati in una soluzione acquosa portata alla concentrazione finale di 0,9 mg/100ml di NaCl. L'iniezione intramuscolare della soluzione contenente DNA é stata seguita da elettroporazione del sito di inoculo con due pulses di 25 milli-secondi a voltaggio di 120 V, erogato mediante un calibro collegato allo strumento T820 Electro Square Porator (San Diego, CA, U.S.A.).

VACCINAZIONE TRAMITE VETTORE ADENOVIRALE

L'inoculo del costrutto adenovirale ricombinante viene effettuato a livello intramuscolare (i.m.). Gli animali vengono immunizzati con 5×10^6 PFU/topo.

INOCULO DEL TUMORE

Topi C57BL/6J sono stati inoculati endovena (i.v.) con 10^5 cellule B16LU8, linea di melanoma murino. Dopo 14 giorni dall'inoculo vengono prelevati i polmoni e inclusi in formalina. Su questi verrà poi stimato il numero di metastasi. Topi

C57Bl/6J sono stati inoculati sottocute (s.c.) con 1×10^6 cellule C2 o con 0.2×10^6 cellule B16447.

TRASFERIMENTO ADOTTIVO DI CTL

Modello di melanoma metastatico polmonare

Dopo 3 giorni dall'inoculo (i.v.) della linea B16Lu8, gli animali vengono inoculati con 5×10^6 CTL a topo e trattati tramite somministrazione di 60000IU/topo/die di IL-2 ricombinante tramite inoculo intraperitoneale (i.p.). La somministrazione di IL-2 viene eseguita anche nei due successivi giorni dal trasferimento adottivo dei CTL. Gli animali vengono quindi sacrificati dopo 15 giorni dall'inoculo del tumore e i loro polmoni prelevati e fissati per la successiva conta delle metastasi.

Modello di tumore sottocutaneo

Quando il tumore raggiunge le dimensioni di circa 10 mm^2 , dopo 14 giorni dall'inoculo del tumore, gli animali vengono sottoposti al trasferimento adottivo di 5×10^6 di CTL, previa linfodeplezione tramite γ -irradiazione total-body (500 cGy). Gli animali vengono poi immunizzati tramite inoculo di 5×10^8 PFU/topo di un vettore adenovirale ricombinante. Gli animali sono quindi trattati tramite somministrazione di 60000IU/topo/die di IL-2 ricombinante tramite inoculo (i.p.). La somministrazione di IL-2 viene eseguita anche nei due giorni successivi al trasferimento adottivo dei CTL. Le dimensioni del tumore vengono monitorate ogni due giorni. Gli animali vengono sacrificati quando il tumore raggiunge i 100 mm^2 .

ANALISI ISTOLOGICA E IMMUNOISTOCHEMICA

Le prostate vengono disecate dall'albero urogenitale e fissate usando il fissativo PLP (Parafolmaldeide/Lisina/Periodato), preparato sciogliendo 0.085 grammi di Sodio m-Periodato (Sigma-Aldrich, St.Louis, MO, U.S.A.) in una soluzione costituita da 10 ml di parafolmaldeide all'8% (Sigma-Aldrich, St.Louis, MO, U.S.A.) e 30 ml di una soluzione di Lisina. Quest'ultima soluzione è preparata sciogliendo 16.4 grammi di L-Lisina (Sigma-Aldrich, St.Louis, MO, U.S.A.) in 450 ml di acqua de-ionizzata e 450 ml di buffer Sorrensons 0.1 M. Il campione

viene fissato per non più di 3 ore e successivamente viene lavato nel buffer Sorrensons 0.1 M e quindi conservato in una soluzione di PBS addizionato di saccarosio al 20%. Successivamente il campione viene fissato in paraffina e tagliato al criostato. Le sezioni di tessuto tagliate al criostato vengono lasciate ad asciugare all'aria per tutta la notte e poi fissate in formalina tamponata al 4% per 8 minuti e in tre passaggi in alcool 99° per 2 minuti complessivamente. In seguito le sezioni vengono sottoposte a tre risciacqui da 5 minuti ciascuno in TBS e a smascheramento antigenico con tampone citrato a pH6 in forno a microonde per 10 minuti. I vetrini sono stati quindi incubati prima con il Protein Block Serum-Free (DakoCytomation, Danimarca) per 10 minuti e poi con l'Ab primario rabbit anti-mouse Telomerase (Abcam Cod. 23699, U.K) diluito 1:100 per tutta la notte a 4°C. Le sezioni sono state quindi risciacquate con TBS ed incubate con l'EnVision System Labelled Polymer-HRP anti Rabbit (DakoCytomation, Danimarca) per 30'. Dopo aver risciacquato con PBS, i vetrini sono stati incubati con la DAB per 10' quindi risciacquati con acqua distillata. Il contrasto nucleare è stato effettuato con un breve passaggio in Ematossilina di Mayer per 10''. L'analisi istologica prevede una colorazione Ematossilina-Eosina effettuata tramite tre passaggi in Bioclear e successivi passaggi in alcoli decrescenti (99°, 99°, 95°, 80°). Quindi colorati con Ematossilina di Mayer per 2' e 30", lavaggi con acqua di fonte e colorazione con Eosina 0.25%, lavaggi con acqua di fonte e passaggi in alcoli crescenti (95°, 99°, 99°). Quindi i vetrini vengono montati con un balsamo permanente.

ANALISI STATISTICHE

Le analisi statistiche sono state effettuate mediante test t di Student. Si è considerata una soglia di significatività pari a 0.05.

RISULTATI

Comparazione tra due protocolli di immunizzazione attiva basati su vaccini a DNA codificanti l'antigene telomerasi murina (m-TERT).

Il primo passo del progetto è stato identificare il miglior protocollo di immunizzazione attiva capace di espandere una popolazione di linfociti T specifici per l'epitopo m-TERT₁₉₈₋₂₀₅ della ribonucleoproteina telomerasi murina presentato dalle molecole MHC di classe I. Abbiamo, pertanto, paragonato l'impiego di due diverse strategie vaccinali: la prima basata sulla doppia somministrazione di DNA plasmidico (protocollo#1, Figura 1); la seconda basata sull'utilizzo di un regime a "prime-boost" eterologo (protocollo#2, Figura 1).

Nel primo caso topi TRAMP sono stati vaccinati a partire dalla 6^a settimana di età tramite inoculo di 50 µg/topo del vettore plasmidico pVIJnsA, vuoto o codificante l'antigene m-TERT, seguito dall'elettroporazione della sede d'inoculo, e richiamati con la medesima metodica dopo 14 giorni. Nel secondo caso topi TRAMP sono stati vaccinati a partire dalla 6^a settimana di età tramite inoculo di 50 µg/topo del vettore plasmidico pVIJnsA, vuoto o codificante l'antigene m-TERT, seguito dall'elettroporazione della sede d'inoculo e richiamati dopo 14 giorni tramite somministrazione di un vettore adenovirale ricombinante (5x10⁸ PFU/topo). Agli animali vaccinati con il plasmide vuoto è stato somministrato un vettore adenovirale ricombinante codificante il gene reporter della medusa *Aequorea victoria*: *enhanced green fluorescent protein* (EGFP), mentre agli animali vaccinati con il plasmide codificante m-TERT è stato somministrato un vettore adenovirale esprimente la medesima sequenza genica. Come controllo dell'efficacia della modalità vaccinale, topi TRAMP sono stati vaccinati con lo stesso protocollo verso la proteina immunogenica β-galattosidasi (β-gal). Dopo 2 settimane dal richiamo, gli animali sono stati sacrificati per effettuare una serie di analisi volte a valutare l'impatto dell'intervento vaccinale in termini di selezione ed espansione di linfociti T funzionali e specifici per l'antigene di interesse.

Premessa essenziale per queste analisi è stata l'identificazione dell'epitopo immunodominante di telomerasi murina ristretto per l'aplotipo H-2^b del ceppo C57BL/6J (allele K^b) non ancora descritto in letteratura. L'epitopo m-TERT₁₉₈₋₂₀₅ (VGRNFTNL) è stato identificato dal gruppo della Dr.ssa Elisa Scarselli dell'Istituto di Ricerca di Biologia Molecolare (IRBM) di Pomezia, tramite

screening di un pannello completo di peptidi che coprivano l'intera sequenza di telomerasi e successiva analisi bioinformatica utilizzando gli algoritmi predittivi BIMAS e SYFPEITHI (www.bimas.ciy.nih.gov; www.syfpeithi.de/).

La capacità della vaccinazione di indurre linfociti T specifici per l'epitopo m-TERT₁₉₈₋₂₀₅ è stata valutata *ex-vivo* tramite test ELISPOT per rilascio di IFN- γ , un saggio in cui 1×10^6 di splenociti di topi TRAMP, precedentemente vaccinati con il protocollo#1 o protocollo#2, sono stati stimolati per 24 ore con 10 U/ml di IL-2 ricombinante e in presenza di 1 μ g/ml del peptide immunodominante m-TERT₁₉₈₋₂₀₅ (p-198), del peptide subdominante m-TERT₄₈₆₋₄₉₃ (p-486) o del peptide β -gal₉₆₋₁₀₃ (p- β gal), usato come controllo (Figura 2). Il test ha evidenziato come la vaccinazione a "prime-boost" riesce ad espandere un numero di linfociti T specifici per l'epitopo m-TERT₁₉₈₋₂₀₅ (media 347 spots) maggiore rispetto alla vaccinazione a solo DNA plasmidico (media 25,66 spots), e tale efficacia è risultata indipendente dall'antigene. Infatti, risultati simili sono stati ottenuti utilizzando le medesime metodiche vaccinali verso l'antigene esogeno β -gal: il regime a "prime-boost" eterologo riesce ad espandere un numero maggiore di linfociti T specifici per il peptide β -gal₉₆₋₁₀₃ (media 653 spots) rispetto alla vaccinazione a solo DNA plasmidico (media 162 spots). Dato interessante è stato il fatto che entrambe le modalità vaccinali sono risultate molto selettive: infatti, come si evince dalla figura 2, animali vaccinati contro l'antigene β -gal riconoscono esclusivamente il peptide β -gal₉₆₋₁₀₃ mentre non riconoscono i due peptidi dell'antigene telomerasi (m-TERT₁₉₈₋₂₀₅ e m-TERT₄₈₆₋₄₉₃, $p < 0.05$); al contrario, gli animali vaccinati contro l'antigene telomerasi presentano linfociti T specifici unicamente per il peptide immunodominante m-TERT₁₉₈₋₂₀₅ non riconoscendo né il peptide β -gal₉₆₋₁₀₃ né il peptide subdominante m-TERT₄₈₆₋₄₉₃ ($p < 0.05$). Quest'ultima osservazione conferma che l'epitopo m-TERT₁₉₈₋₂₀₅ risulta essere effettivamente l'epitopo immunodominante.

A confermare la superiorità immunogenica del regime a "prime-boost" rispetto la vaccinazione a solo DNA plasmidico nell'espansione di linfociti T specifici per l'antigene di interesse, è stata anche l'analisi citofluorimetrica con tetrameri specifici K^b m-TERT₁₉₈₋₂₀₅ (tet-m-TERT). Il numero di linfociti T CD3⁺/CD8⁺/m-TERT specifici è stato valutato *in vitro* dopo una cocoltura di 5 giorni degli splenociti degli animali immunizzati con il peptide m-TERT₁₉₈₋₂₀₅ (MLPC). Le MLPC derivanti dagli animali immunizzati con il regime "prime-boost"

presentavano un numero di linfociti T CD3⁺/CD8⁺/tet-TERT⁺ pari al 4,5% mentre le MLPC derivanti dagli animali vaccinati con solo DNA plasmidico presentavano un numero di linfociti T CD3⁺/CD8⁺/tet-TERT⁺ pari solo al 0,32% (Figura 3).

Questi dati nel loro insieme evidenziano come la vaccinazione a "prime-boost" risulta esser di gran lunga più efficace nell'espandere linfociti T antigene specifici rispetto alla vaccinazione a DNA plasmidico.

Sorprendentemente, tuttavia, a quest'espansione non ha corrisposto la stessa differenza nella funzionalità dei linfociti T *in vitro*. Infatti, sia le MLPC derivate dalle milze degli animali vaccinati con il regime "prime-boost" che quelle derivate dalle milze degli animali vaccinati con il solo DNA plasmidico erano in grado di riconoscere unicamente bersagli cellulari pulsati con il peptide specifico, in saggi E.L.I.S.A. per rilascio di IFN- γ . In questi stessi saggi cellule tumorali, telomerasi-positive ma non pulsate con il peptide immunodominante, non erano affatto riconosciute, suggerendo una bassa affinità di legame del TCR dei linfociti T TERT-specifici al complesso peptide-K^b presente sulla superficie delle cellule tumorali. Per selezionare linfociti T a maggior avidità per il complesso costituito dalle molecole di prima classe di aplotipo K^b e l'epitopo m-TERT₁₉₈₋₂₀₅ abbiamo deciso di stimolare ripetutamente le MLPC *in vitro* utilizzando splenociti singenici γ -irradiati e pulsati con dosi basse di peptide (0.1 μ M). Una quantità limitata di peptide in coltura consente di stimolare solamente i linfociti T ad alta affinità che, proliferando selettivamente, riescono a superare in numero i linfociti T a bassa affinità, come precedente dimostrato da altri ricercatori per antigeni diversi da telomerasi (Martha Miller – Jay Berzofsky). Ad ogni ristimolazione le MLPC sono state testate in saggi E.L.I.S.A. per il rilascio di IFN- γ contro bersagli cellulari dello stesso aplotipo (H-2^b) ma di differente istologia (Figura 4).

Abbiamo utilizzato come bersagli cellulari la linea di melanoma murino B16 e la linea di carcinoma prostatico murino C2-TRAMP e i loro corrispettivi transfettanti per l'espressione della molecola costimolatoria B7.1 (CD80): B16-B7.1 e C2-B7.1. L'utilizzo della transfezione per indurre l'espressione della molecola CD80 trova il suo razionale nel fatto che il legame di questa molecola (presente nella cellula tumorale) con il corrispettivo legante CD28 (presente a livello della membrana plasmatica del linfocita T) riduce la soglia di stimolazione necessaria ad attivare il linfocita T dopo interazione tra il complesso MHC-peptide della cellula tumorale ed il TCR del linfocita T.

Come controllo positivo è stata utilizzata la linea di linfoma murino MBL2 pulsata con il peptide m-TERT₁₉₈₋₂₀₅ (MBL2-p198), mentre come controllo negativo abbiamo utilizzato la stessa linea pulsata con il peptide β -gal₉₆₋₁₀₃ (MBL2-p β gal). Abbiamo scelto questa linea cellulare perchè non viene riconosciuta *in vitro* da linfociti T m-TERT specifici.

Inaspettatamente, solo le MLPC derivate dagli animali vaccinati con DNA plasmidico hanno presentato un incremento d'attività funzionale indotto dalle ristimolazioni *in vitro*, riuscendo a riconoscere anche i bersagli cellulari tumorali non pulsati con il peptide specifico. Infatti, sebbene i livelli di IFN- γ rilasciati dalle MLPC derivate dagli animali vaccinati con DNA plasmidico dopo cocoltura con i vari bersagli cellulari siano risultati inferiori rispetto a quelli del controllo positivo MBL2-p198 questi linfociti riconoscono cellule di melanoma B16 e cellule di carcinoma prostatico C2-TRAMP, soprattutto quando queste linee esprimono B7.1 (Figura 4). Al contrario le MLPC derivate dagli animali vaccinati con il regime a "prime-boost" presentavano un rilascio marginale di IFN- γ dopo cocoltura con i bersagli cellulari non pulsati con il peptide immunodominante. Entrambe le MLPC mantenevano, tuttavia, la loro specificità per l'antigene anche dopo varie ristimolazioni, riconoscendo unicamente le cellule caricate con il peptide specifico m-TERT₁₉₈₋₂₀₅ e non le cellule caricate con il peptide aspecifico β -gal₉₆₋₁₀₃ (Figura 4). Questi dati di stimolazione con basse dosi di peptide ci suggeriscono che la vaccinazione a DNA plasmidico, anche se non è in grado di espandere un numero consistente di linfociti T specifici per telomerasi, è in grado di dare un "priming" di popolazioni linfocitarie a più alta affinità rispetto alla vaccinazione a "prime-boost".

A confermare questi dati è stata l'analisi "spectratyping" della catena V β del TCR delle MLPC, condotta dal Dr. Raffaele De Palma dell'Università di Napoli. Utilizzando primers specifici per la regione CDR3 del TCR è stato possibile clonare la sequenza della catena V β del TCR ad alta avidità di un clone (clone 7) in grado di riconoscere telomerasi (descritto di seguito). Questa catena è risultata essere V β -11. L'analisi "spectratyping" con primers specifici per la catena V β -11 eseguita sulle MLPC derivate dagli animali vaccinati con solo DNA plasmidico a vari passaggi *in vitro*, ha evidenziato come le ripetute ristimolazioni determinano una progressiva espansione clonale dei linfociti T con arricchimento di TCR caratterizzato dalla catena V β -11 (Figura 5A). Questa selezione selettiva per la

catena V β -11 del TCR risulta piú evidente dall'analisi della distribuzione del clonotipo del clone ad alta affinità all'interno delle MLPC dopo varie ristimolazioni: la percentuale di TCR del clone 7 tra i linfociti con catena V β -11 è solo del 5% al primo passaggio *in vitro* per poi passare al 60% dopo 8 ristimolazioni *in vitro* (Figura 5B). E' verisimile, quindi, che la progressiva acquisizione della capacità di riconoscere bersagli cellulari telomerasi-positivi di diversa istologia è dovuta all'espansione di linfociti T a maggior affinità. Se consideriamo, quindi, l'aspetto dell'affinità di riconoscimento dell'antigene telomerasi, la vaccinazione con il solo DNA plasmidico risulta piú efficace della vaccinazione "prime-boost" in quanto è in grado di selezionare linfociti T funzionalmente efficaci nel riconoscere il complesso costituito dalle molecole di prima classe di aplotipo K^b e l'epitopo m-TERT₁₉₈₋₂₀₅ fisiologicamente presente sulla membrana plasmatica delle cellule tumorali.

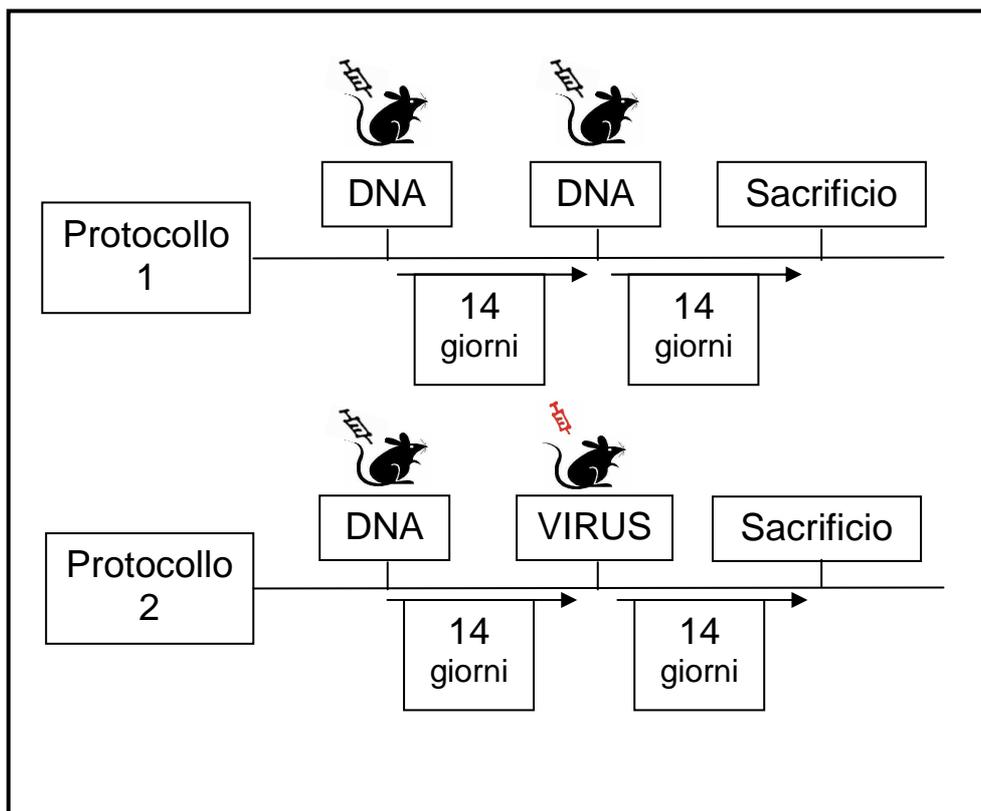


Figura 1: Schematizzazione dei protocolli di vaccinazione utilizzati in questo studio.

Protocollo#1 - Doppia somministrazione di vaccino a DNA plasmidico. Topi TRAMP sono stati vaccinati a partire dalla 6^a settimana di età tramite inoculo di 50 µg/topo del vettore plasmidico pVIJnsA vuoto o codificante m-TERT, seguito dall'elettroporazione della sede di inoculo, e successivamente richiamati con la medesima metodica dopo 14 giorni. Dopo due settimane dal richiamo, alcuni animali sono stati sacrificati per le analisi volte a valutare l'efficacia dell'intervento vaccinale.

Protocollo#2 - Regime a "prime boost" eterologo. Topi TRAMP sono stati vaccinati a partire dalla 6^a settimana di età tramite inoculo di 50 µg/topo del vettore plasmidico pVIJnsA vuoto o codificante m-TERT seguito dall'elettroporazione della sede di inoculo. Dopo 14 giorni gli animali sono stati richiamati tramite somministrazione di un vettore adenovirale ricombinante codificante la proteina EGFP o m-TERT (5×10^8 PFU/topo). Dopo due settimane dal richiamo, alcuni animali sono stati sacrificati per le analisi volte a valutare l'efficacia dell'intervento vaccinale.

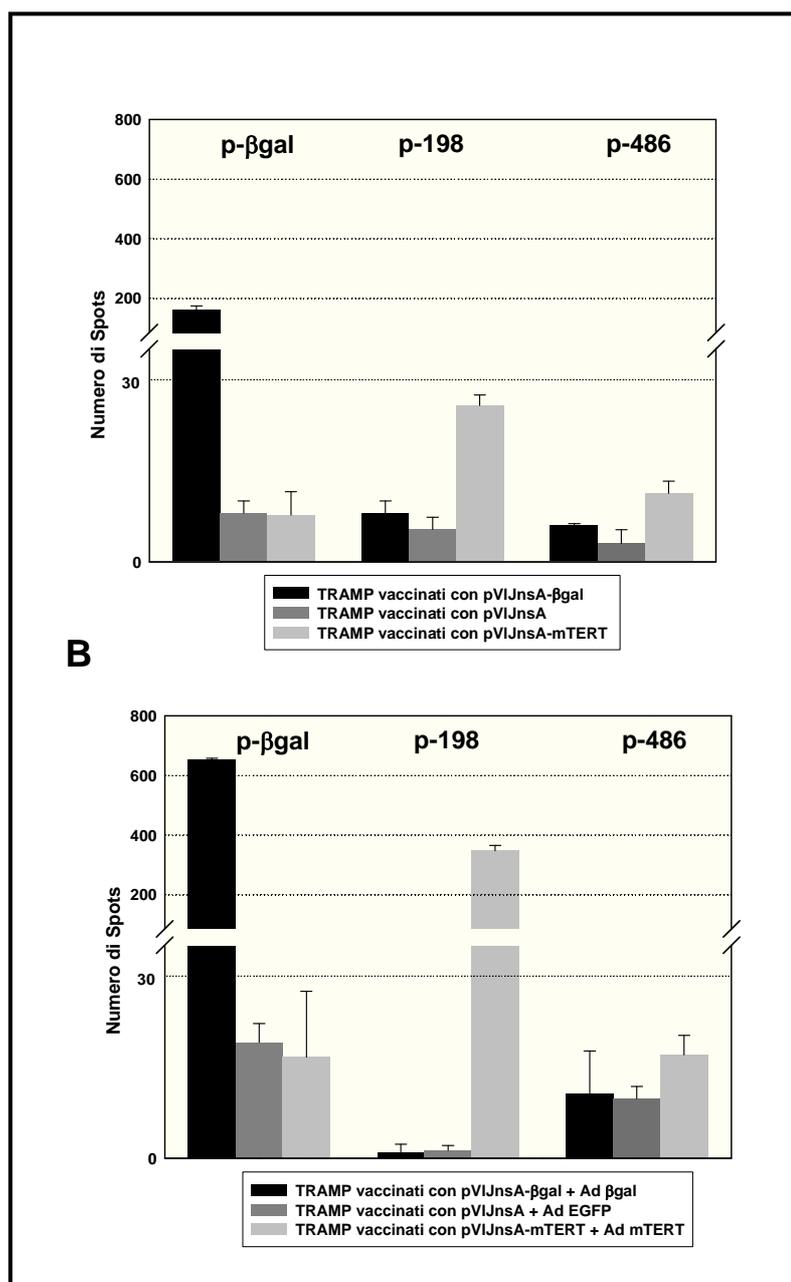


Figure 2: Valutazione dell'espansione di linfociti m-TERT specifici indotta dalla vaccinazione.

A) 1×10^6 splenociti di topi TRAMP, precedentemente vaccinati con il protocollo#1, sono stati stimolati per 24 ore con 10 U/ml di IL-2 ricombinante, in presenza di 1 $\mu\text{g/ml}$ del peptide immunodominante m-TERT₁₉₈₋₂₀₅ (p-198) o del peptide subdominante m-TERT₄₈₆₋₄₉₃ (p-486) di telomerasi murina o del peptide di controllo $\beta\text{-gal}_{96-103}$ (p-βgal). La produzione di IFN- γ è stata rilevata in un saggio ELISPOT. Come controllo dell'efficacia della modalità vaccinale, topi TRAMP sono stati vaccinati con il plasmide codificante $\beta\text{-gal}$ e i loro splenociti stimolati nelle medesime condizioni descritte.

B) 1×10^6 splenociti di topi TRAMP, precedentemente vaccinati con il protocollo#2, sono stati saggiati come descritto in A.

I dati sono rappresentati come media \pm S.E. di triplicati.

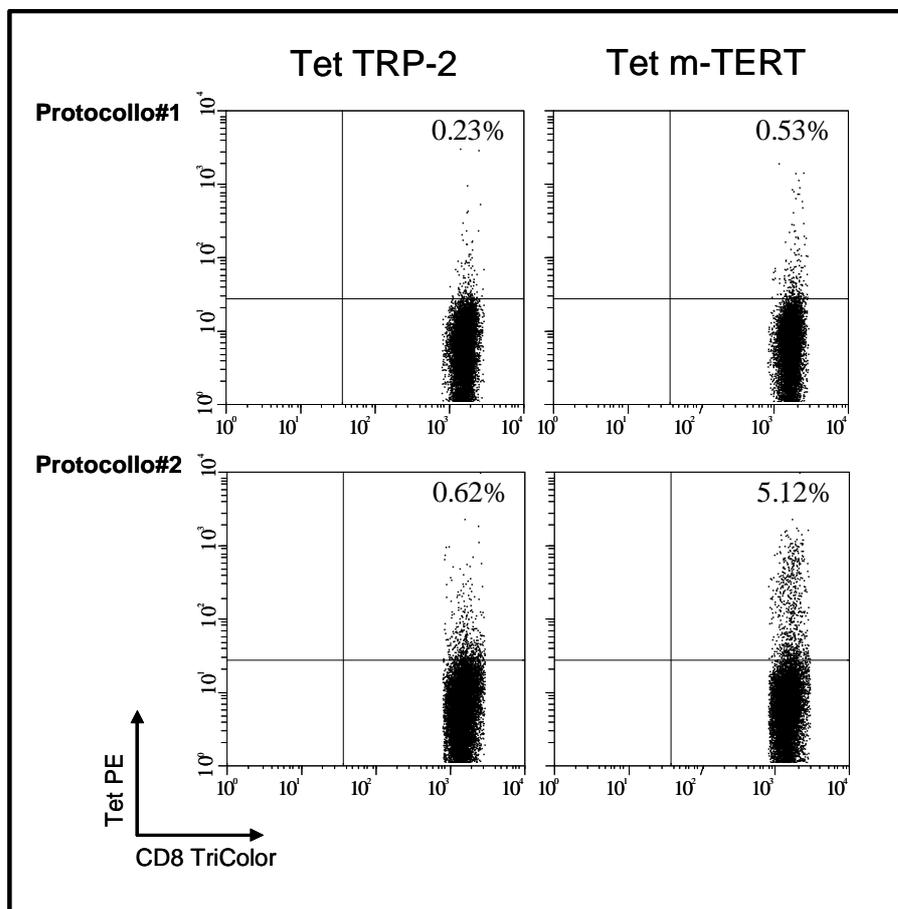


Figura 3: Valutazione dell'espansione di linfociti T CD8⁺/ m-TERT specifici dopo stimolazione in vitro per 5 giorni con il peptide m-TERT₁₉₈₋₂₀₅ (MLPC).

5×10^6 splenociti di topi TRAMP precedentemente vaccinati con il protocollo#1 o con il protocollo#2, sono stati messi in coltura per 5 giorni con $0.1 \mu\text{g/ml}$ di peptide m-TERT₁₉₈₋₂₀₅ (MLPC). Per l'analisi citofluorimetrica, 0.5×10^6 cellule di MLPC sono state marcate con anti-CD3-FITC e anti-CD8-Tricolor insieme al tetramero PE-K^b/m-TERT₁₉₈₋₂₀₅ (Tet m-TERT) o con tetramero PE-K^b/TRP-2₁₈₀₋₁₈₈ (Tet TRP-2) come controllo negativo. La percentuale di cellule CD8⁺/Tet⁺ è riferita su una popolazione positiva per l'espressione del CD3.

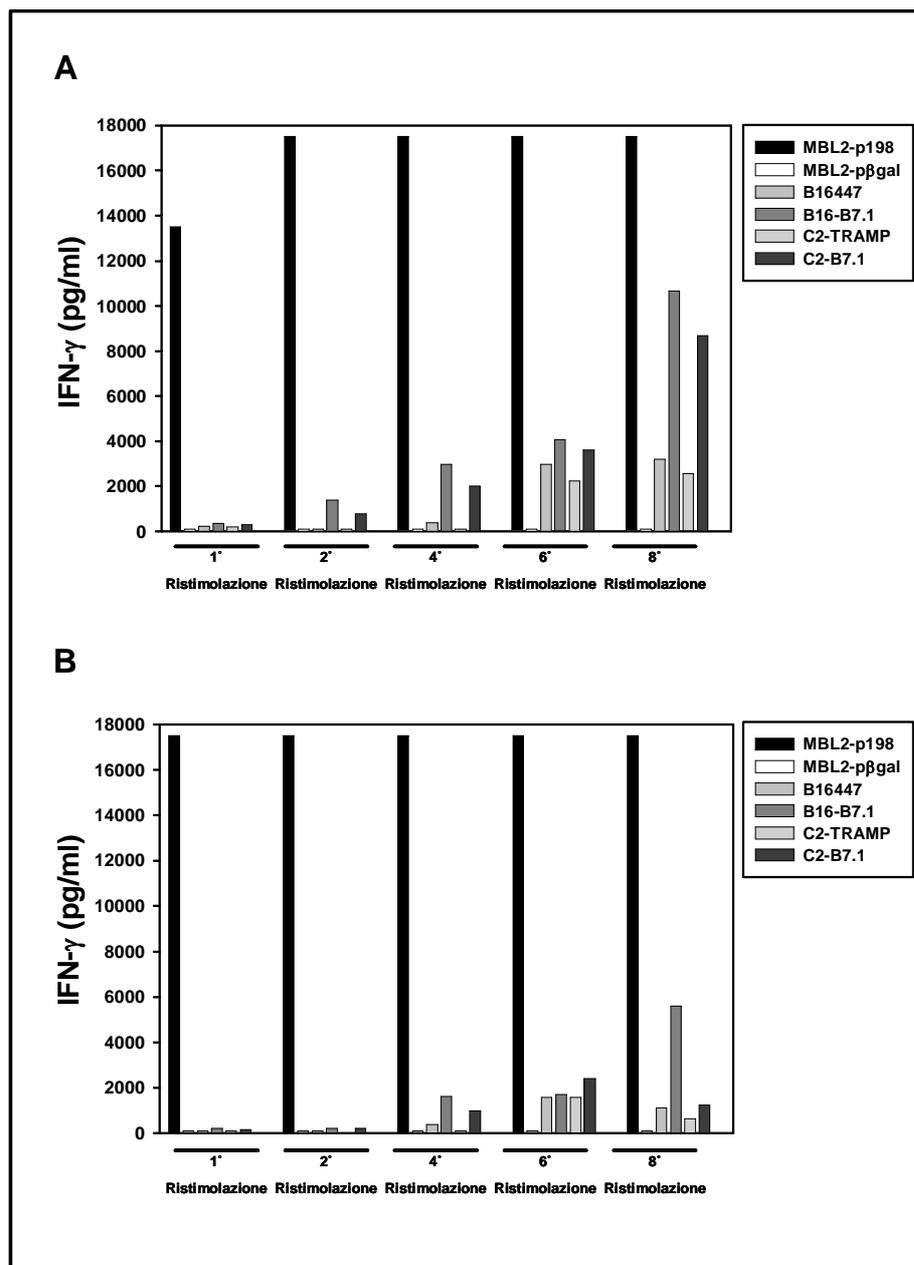


Figura 4: Valutazione dell'attività funzionale di linfociti T specifici per l'epitopo m-TERT₁₉₈₋₂₀₅ *in vitro*.

5×10^6 splenociti di topi TRAMP precedentemente vaccinati con il protocollo#1 (A) o con il protocollo#2 (B), sono stati messi in coltura per 5 giorni con $0.1 \mu\text{g/ml}$ di peptide m-TERT₁₉₈₋₂₀₅ (MLPC). 0.2×10^6 cellule delle MLPC sono state ristimate settimanalmente *in vitro* con 5×10^6 splenociti singenici γ -irradiati e pulsati con dosi basse di peptide m-TERT₁₉₈₋₂₀₅ ($0.1 \mu\text{M}$) ed in presenza di 20 U/ml di IL-2 ricombinante in piastre da 24 pozzetti. Per il test funzionale, 0.1×10^6 cellule delle MLPC, ottenuti dopo varie ristimolazioni, sono state cimentate per 24 ore, in rapporto 1:1, con cellule di linee tumorali di diverso istotipo ma di stesso aplotipo H-2^b, in $200 \mu\text{l}$ di volume finale. Dopo 24 ore, i surnatanti di coltura sono stati saggati in un test E.L.I.S.A. per il valutare il rilascio di IFN- γ . Come controllo positivo è stata utilizzata la linea MBL2 pulsata con il peptide m-TERT₁₉₈₋₂₀₅ (MBL2-p198) e come controllo negativo è stata impiegata la stessa linea pulsata con il peptide scorrelato $\beta\text{-gal}_{96-103}$ (MBL2-p βgal).

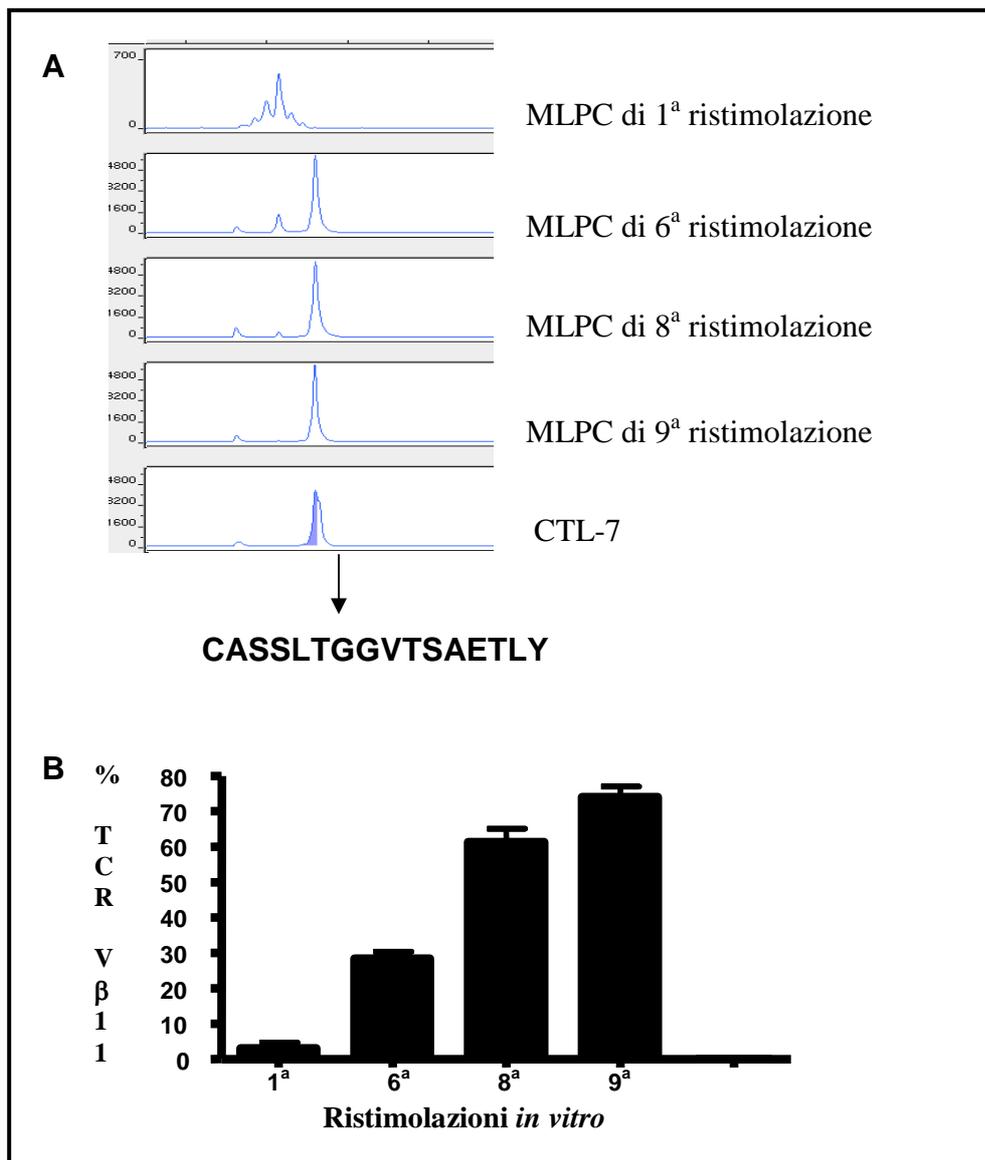


Figura 5: Analisi "spectratyping" e clonotipica del TCR delle MLPC dopo varie ristolazioni *in vitro*.

A) Analisi della lunghezza della regione CDR3 per la famiglia TCR-V β 11 delle MLPC a varie ristolazioni *in vitro*. Parallela mente con l'aumentare dei passaggi si nota una restrizione del repertorio di questa famiglia, visualizzata nella figura dalla predominanza di un singolo picco, corrispondente ad una regione CDR3 di una determinata lunghezza. Una preliminare analisi SSCP (data not shown) ci ha rivelato, fin dal passaggio 6, la presenza di una sequenza predominante. La SSCP ci ha mostrato una sequenza predominante anche nel clone CTL-7, per questo motivo abbiamo scelto di cominciare la sequenza diretta del prodotto di PCR con primers specifici disegnati sulla porzione costante 5'-3' della V β 11 e sulla regione costante del TCR per l'altro senso. I dati ottenuti ci hanno permesso di identificare la sequenza del CDR3 (qui riportati gli aminoacidi).

B) Abbiamo quindi disegnato un primer clonotipico nella regione CDR3 e amplificato in REAL TIME per il nostro clonotipo di interesse e per l'intera famiglia V β 11 secondo un protocollo da noi e altri descritto (De Palma, Marigo et al. 2004). La figura esprime la percentuale di espressione del clonotipo di nostro interesse in rapporto all'intera famiglia V β 11.

Valutazione dell'effetto terapeutico del trasferimento adottivo della popolazione policlonale di linfociti T citotossici (CTL) specifici per l'epitopo m-TERT₁₉₈₋₂₀₅ in animali portatori di tumore.

Una volta completata la caratterizzazione funzionale dei CTL derivati dagli animali vaccinati a solo DNA plasmidico e specifici per l'epitopo m-TERT₁₉₈₋₂₀₅, lo studio è proseguito nel valutare la loro efficacia *in vivo* nel contrastare la crescita tumorale in animali portatori di neoplasia. Abbiamo studiato l'effetto terapeutico sia in un modello di metastatizzazione polmonare che in modelli di crescita tumorale indotta dall'inoculo sottocutaneo di linee cellulari.

Nel caso del modello di metastatizzazione, abbiamo inoculato endovena la linea di melanoma B16 in animali C57BL/6J e, 3 giorni dopo l'inoculo, abbiamo trasferito ad un gruppo di animali (n=5) 5×10^6 CTL m-TERT₁₉₈₋₂₀₅-specifici, mentre un gruppo di ugual numero di animali non è stato trattato. A entrambi i gruppi sperimentali sono state somministrate 60000 IU/topo/die di IL-2 ricombinante, tramite inoculo intraperitoneale (i.p.). La somministrazione di IL-2 è stata eseguita anche nei due successivi giorni dal trasferimento adottivo dei CTL. Gli animali sono stati sacrificati dopo 15 giorni dall'inoculo del tumore e l'effetto terapeutico è stato valutato mediante conta in doppio cieco del numero di metastasi polmonari: il gruppo di animali trattati con il trasferimento adottivo di CTL specifici per l'epitopo m-TERT₁₉₈₋₂₀₅ presentavano un numero di metastasi significativamente inferiore rispetto agli animali non trattati (p=0.0004), come verificato in due esperimenti indipendenti (Figura 6).

Nel caso del modello di tumore trapiantabile, abbiamo deciso di utilizzare due tumori di diversa istologia: la linea di melanoma B16 (Figura 7) e la linea di carcinoma prostatico C2-TRAMP (Figura 8). L'impianto sperimentale ha previsto l'inoculo sottocutaneo, nel fianco destro dell'animale, in topi C57BL/6J di 0.2×10^6 cellule di melanoma B16 o di 1×10^6 cellule di carcinoma prostatico C2-TRAMP. Quando il tumore presentava dimensioni di 10 mm^2 , all'incirca dopo 14 giorni dall'inoculo del tumore, gli animali sono stati sottoposti al trasferimento adottivo di CTL specifici per l'epitopo m-TERT₁₉₈₋₂₀₅ (m-TERT CTL, n=5) o CTL specifici per l'epitopo β -gal₉₆₋₁₀₃ (β -gal CTL, n=5) tramite inoculo endovenoso (i.v). Alcune ore prima dell'inoculo dei CTL, gli animali sono stati sottoposti a mielo-linfo-deplezione tramite γ -irradiazione "total-body" (500 cGy) per

eliminare le popolazioni in grado di ostacolare la proliferazione dei linfociti trasferiti, come descritto precedentemente nell'introduzione. Alcune ore dopo il trasferimento dei CTL, gli animali sono stati immunizzati tramite inoculo intramuscolo (i.m) di 5×10^8 PFU/topo di un vettore adenovirale ricombinante codificante m-TERT o β -gal. A entrambi i gruppi sono state inoltre somministrate 60000 IU/topo/die di IL-2 ricombinante, tramite inoculo intraperitoneale (i.p.). La somministrazione di IL-2 è stata eseguita anche nei due giorni successivi al trasferimento adottivo dei CTL. Le dimensioni del tumore sono state monitorate ogni due giorni e gli animali sono stati sacrificati quando il tumore ha raggiunto le dimensioni di 100 mm^2 .

Abbiamo dimostrato che, in entrambi i modelli, il trasferimento adottivo è stato in grado di rallentare significativamente la crescita tumorale rispetto al gruppo di controllo. Infatti, gli animali trattati con i CTL specifici per l'epitopo m-TERT₁₉₈₋₂₀₅ presentano un incremento significativo della sopravvivenza rispetto agli animali trattati con i CTL specifici per l'epitopo β -gal₉₆₋₁₀₃. In conclusione, questi dati dimostrano l'efficacia dall'immunoterapia adottiva nel trattamento di tumori ed evidenziano come l'antigene TERT sia potenzialmente utilizzabile come bersaglio di interventi immunoterapici anti-tumorali rivolti a neoplasie di diversa istologia.

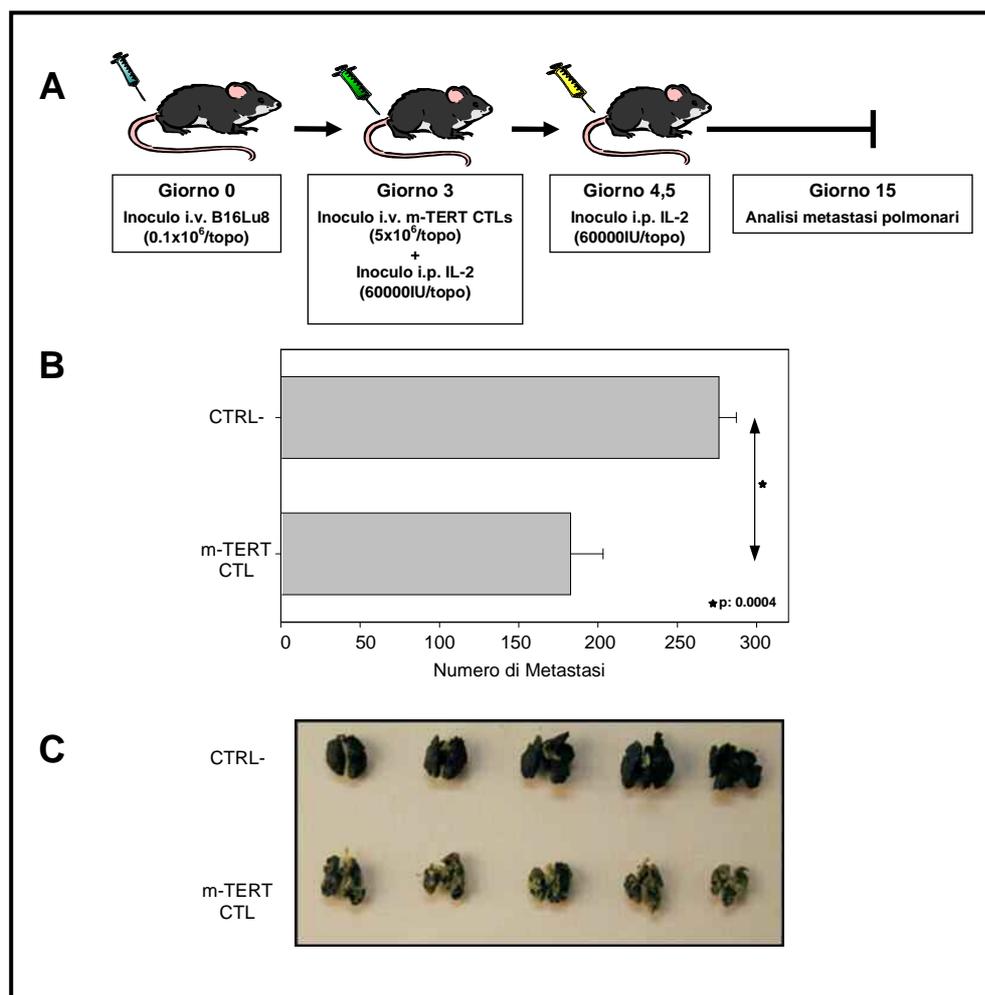


Figura 6: Effetto terapeutico del trasferimento adottivo di linfociti T citotossici policlonali, m-TERT-specifici, in un modello di melanoma metastatico.

A) Lo schema dell'impianto sperimentale prevede l'inoculo endovenoso di 0.1×10^6 cellule della linea B16Lu8, linea di melanoma murino metastatizzante a livello polmonare, in topi C57BL/6J. Dopo 3 giorni, ad un gruppo di animali ($n=5$) vengono inoculati 5×10^6 CTL policlonali, m-TERT specifici, mentre un gruppo di ugual numero di animali non viene trattato. Ad entrambi i gruppi vengono poi somministrate 60000 IU/topo/die di IL-2 ricombinante tramite inoculo i.p.. La somministrazione di IL-2 viene eseguita anche nei due successivi giorni dal trasferimento adottivo dei CTL. Gli animali vengono, quindi, sacrificati dopo 15 giorni dall'inoculo del tumore ed i loro polmoni prelevati e fissati per la successiva conta delle metastasi.

B) Il numero di metastasi polmonari presenti negli animali trattati con trasferimento adottivo di CTL m-TERT specifici (m-TERT CTL) o negli animali non trattati (CTRL-) è rappresentato come media \pm SE. Il risultato è cumulativo di due esperimenti indipendenti, condotti nelle medesime condizioni.

C) Immagine dei polmoni prelevati e fissati dopo 15 giorni dall'inoculo del tumore in uno dei due esperimenti condotti.

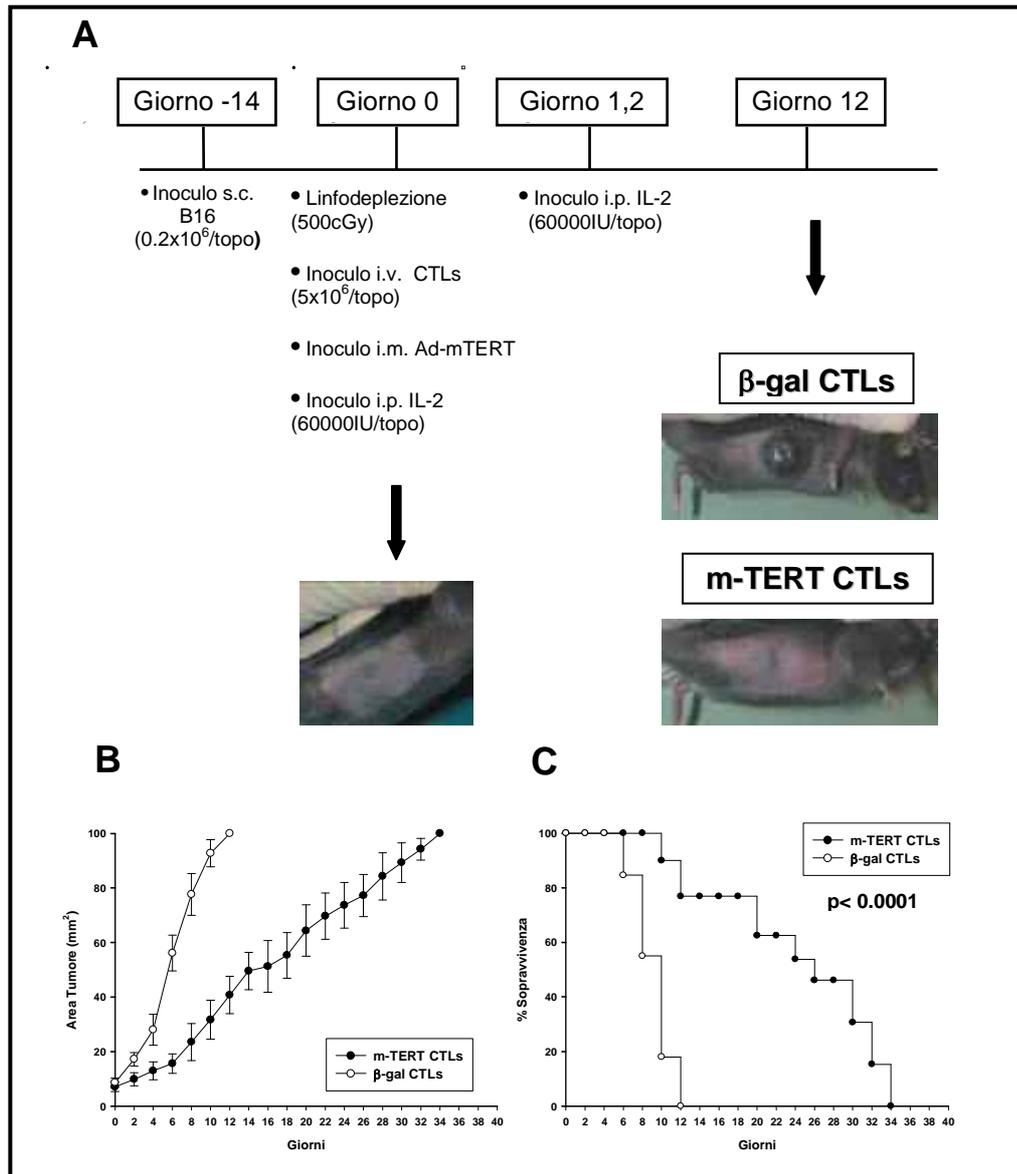


Figura 7: Effetto terapeutico del trasferimento adottivo di CTL policlonali m-TERT specifici in animali portatori di melanoma.

A) L'impianto sperimentale prevede l'inoculo sottocutaneo di 0.2×10^6 cellule di melanoma murino B16 nel fianco destro dell'animale. Quando il tumore raggiunge le dimensioni di circa 10 mm^2 , dopo 14 giorni dall'inoculo del tumore, gli animali vengono sottoposti al trasferimento adottivo di CTL specifici per l'epitopo m-TERT₁₉₈₋₂₀₅ (m-TERT CTL, n=5) o CTL specifici per l'epitopo β -gal₉₆₋₁₀₃ (β -gal CTL, n=5), previa linfodeplezione tramite γ -irradiazione total-body (500 cGy). Gli animali vengono poi immunizzati tramite inoculo i.m. di 5×10^8 PFU/topo di un vettore adenovirale ricombinante codificante per la proteina telomerasi murina o la proteina β -galattosidasi. A entrambi i gruppi vengono somministrate 60000 IU/topo/die di IL-2 ricombinante tramite inoculo i.p.. La somministrazione di IL-2 viene eseguita anche nei due giorni successivi al trasferimento adottivo dei CTL. Le dimensioni del tumore vengono monitorate ogni due giorni. Gli animali vengono sacrificati quando il tumore raggiunge i 100 mm^2 .

B) Curve di crescita del tumore B16 nei gruppi sperimentali. Il risultato è cumulativo di due esperimenti indipendenti, condotti nelle medesime condizioni.

C) Curve di sopravvivenza degli animali trattati. Il risultato è cumulativo di due esperimenti indipendenti, condotti nelle medesime condizioni.

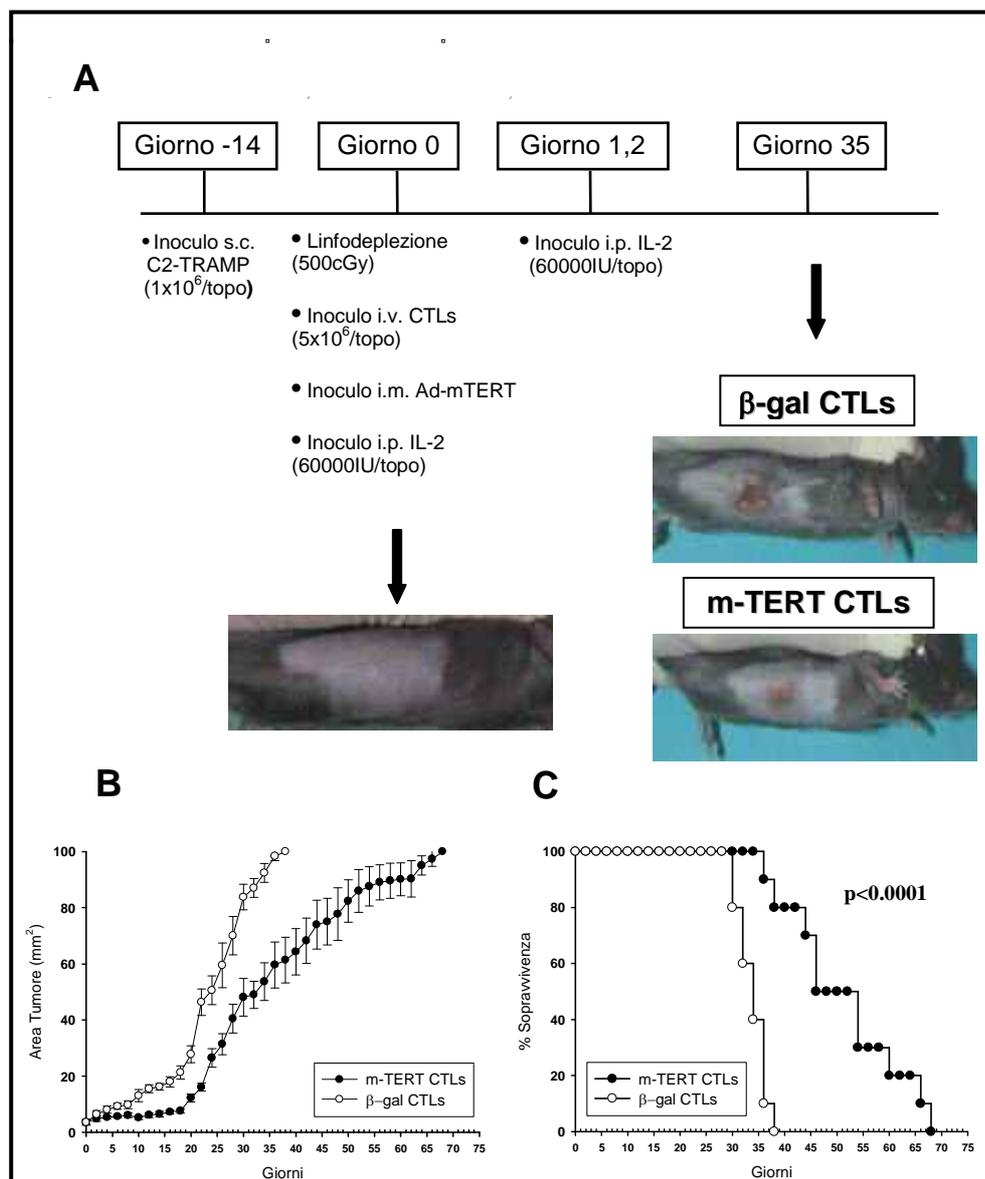


Figura 8: Effetto terapeutico del trasferimento adottivo di CTL policlonali m-TERT specifici in animali portatori di carcinoma prostatico trapiantabile.

A) L'impianto sperimentale prevede l'inoculo sottocutaneo di 1×10^6 cellule di carcinoma prostatico murino C2-TRAMP nel fianco destro dell'animale. Quando il tumore raggiunge le dimensioni di circa 10 mm^2 , dopo 14, giorni dall'inoculo del tumore, gli animali vengono sottoposti al trasferimento adottivo di CTL specifici per l'epitopo m-TERT₁₉₈₋₂₀₅ (m-TERT CTL) (n=5) o di CTL specifici per l'epitopo β-gal₉₆₋₁₀₃ (β-gal CTL) (n=5) come controllo negativo, previa linfodeplezione tramite γ-irradiazione total-body (500 cGy). Gli animali vengono poi immunizzati tramite inoculo i.m. di 5×10^8 PFU/topo di un vettore adenovirale ricombinante codificante per la proteina telomerasi murina o per la proteina β-galattosidasi. A entrambi i gruppi vengono somministrate 60000IU/topo/die di IL-2 ricombinante tramite inoculo i.p.. La somministrazione di IL-2 viene eseguita anche nei due giorni successivi al trasferimento adottivo dei CTL. Le dimensioni del tumore vengono monitorate ogni due giorni. Gli animali vengono sacrificati quando il tumore raggiunge i 100 mm^2 .

B) Curve di crescita del tumore C2-TRAMP nei gruppi sperimentali. Il risultato è cumulativo di due esperimenti indipendenti condotti nelle medesime condizioni.

C) Curve di sopravvivenza degli animali trattati. Il risultato è cumulativo di due esperimenti indipendenti condotti nelle medesime condizioni.

Identificazione e caratterizzazione funzionale di un clone CTL ad alta affinità specifico per l'epitopo m-TERT₁₉₈₋₂₀₅.

Considerando l'eterogeneità della popolazione CTL ottenuta mediante stimolazioni ripetute *in vitro*, il nostro studio è proseguito con l'isolamento di CTL ad alta affinità per l'epitopo m-TERT₁₉₈₋₂₀₅, tramite "limiting-dilution". Abbiamo ottenuto uno spettro di cloni CTL con TCR a diverse avidità per il complesso m-TERT₁₉₈₋₂₀₅-MHC. Tra questi, il clone 7 (CTL-7) è risultato il più interessante. Questo clone, infatti, è risultato avere un TCR costituito dalla catena V β -11 ed è stato in grado di riconoscere un ampio spettro di linee tumorali di diversa istologia (carcinoma prostatico, carcinoma di colon, melanoma e sarcoma) sia tramite saggi di citotossicità (rilascio di ⁵¹Cr) che saggi E.L.I.S.A. per rilascio di IFN- γ .

Un dato interessante è stato il fatto che il livello di riconoscimento del CTL-7 dei diversi bersagli cellulari è risultato uguale a quello del bersaglio cellulare caricato con il peptide m-TERT₁₉₈₋₂₀₅. Inaspettatamente, le linee derivate da tumori ematologici, quali linfomi (MBL2) e timomi (EL-4), non sono state riconosciute. Abbiamo inoltre isolato anche un clone a bassa affinità: il clone 13 (CTL-13). Questo clone presentava caratteristiche opposte al clone CTL-7: infatti, non è stato in grado di riconoscere bersagli cellulari ad eccezione di quelli caricati con il peptide m-TERT₁₉₈₋₂₀₅ (MBL2-p198) e in misura blanda bersagli cellulari transfettati per l'espressione della molecola costimolatoria B7.1/CD80 (Figura 9). Questa diversa funzionalità tra il CTL-7 e il CTL-13 è in linea con l'avidità funzionale dei due CTL per il complesso costituito dalle molecole di prima classe e il peptide m-TERT₁₉₈₋₂₀₅. Infatti, in un test di citotossicità per rilascio di ⁵¹Cr in cui il bersaglio cellulare (MBL2) è stato caricato con concentrazioni scalari di peptide m-TERT₁₉₈₋₂₀₅, il CTL-7 presentava livelli di lisi maggiori rispetto al CTL-13 a parità di concentrazione di peptide caricato (Figura 9).

La caratterizzazione dei cloni specifici per l'epitopo m-TERT₁₉₈₋₂₀₅ è proseguita valutando l'efficacia terapeutica *in vivo*. Abbiamo utilizzato il modello di metastatizzazione a livello polmonare inoculando endovena la linea di melanoma murino B16. Dopo 3 giorni dall'inoculo del tumore, gli animali hanno ricevuto 5x10⁶ cellule del clone CTL-7, del clone CTL-13 o del clone CTL- β -gal, quest'ultimo usato come controllo negativo. I vari gruppi sono stati trattati con 60000IU/topo/die di IL-2 ricombinante tramite inoculo i.p., come descritto in precedenza. Gli animali sono stati sacrificati dopo 15 giorni dall'inoculo del

tumore e l'effetto terapeutico è stato valutato come diminuzione del numero di metastasi: il gruppo di animali trattati con il clone CTL-7 presentavano un numero di metastasi (n=18) significativamente inferiore rispetto agli animali del gruppo di controllo (n=77, $p < 0.001$). Anche gli animali trattati con il clone CTL-13 a bassa affinità presentavano una significativa (n=52, $p = 0.006$) diminuzione del numero di metastasi rispetto al gruppo di controllo ma inferiore rispetto a quella indotta dal clone CTL-7 (Figura 10).

Questi dati dimostrano come l'isolamento e l'espansione *in vitro* di cloni CTL con TCR ad alta affinità per il complesso MHC+peptide antigenico, sia una strategia efficace per potenziare l'effetto terapeutico dell'immunoterapia adottiva nel trattamento dei tumori metastatici.

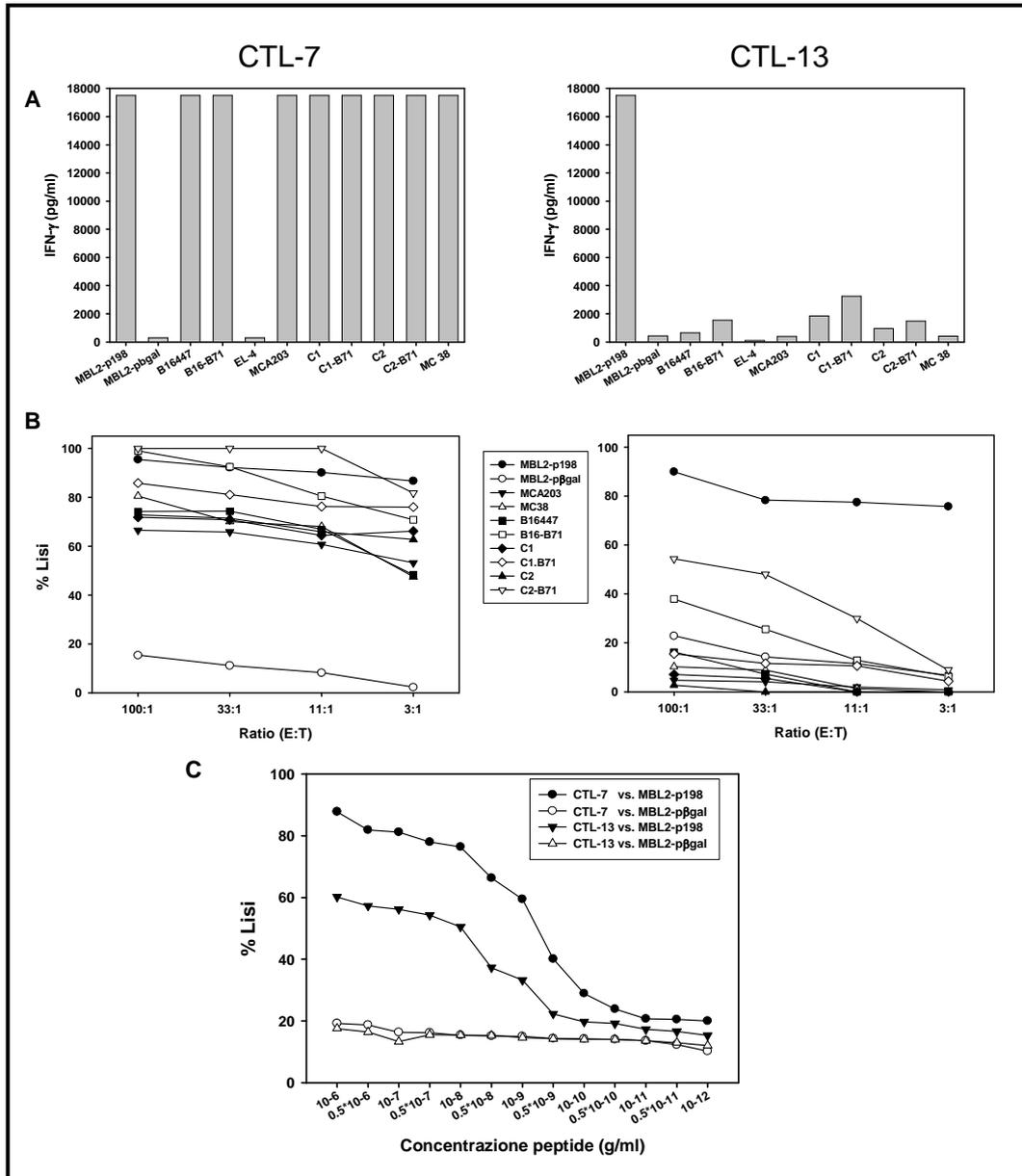


Figura 9: Valutazione dell'attività funzionale di cloni CTL con diversa affinità per l'epitopo m-TERT₁₉₈₋₂₀₅.

A) Test E.L.I.S.A. per rilascio di IFN- γ : 0.1×10^6 cellule dei cloni CTL-7 e CTL-13 sono stati cimentati per 24 ore, in rapporto 1:1, con cellule di linee tumorali di diverso istotipo ma di stesso aplotipo H-2^b, in 200 μ l di volume finale per pozzetto. Dopo 24 ore, i surnatanti di coltura sono stati saggiati in un test E.L.I.S.A. per valutare il rilascio di IFN- γ . Come controllo positivo è stata utilizzata la linea MBL2 pulsata con il peptide m-TERT₁₉₈₋₂₀₅ (MBL2-p198) e come controllo negativo è stata impiegata la stessa linea pulsata con il peptide β -gal₉₆₋₁₀₃ (MBL2-p β gal).

B) I cloni CTL-7 e CTL-13 sono stati coincubati con cellule tumorali di diversa istologia ma di stesso aplotipo H-2^b in un test di citotossicità per rilascio di ⁵¹Cr a breve termine. Come controllo positivo è stata utilizzata la linea MBL2 pulsata con il peptide m-TERT₁₉₈₋₂₀₅ (MBL2-p198) e come controllo negativo è stata impiegata la stessa linea pulsata con il peptide β -gal₉₆₋₁₀₃ (MBL2-p β gal).

C) L'avidità funzionale del clone CTL-7 e del clone CTL-13, entrambi specifici per l'epitopo m-TERT₁₉₈₋₂₀₅, è stata valutata in un test di citotossicità per rilascio di ⁵¹Cr utilizzando un rapporto 10:1 tra effettore e cellula bersaglio. Come cellula bersaglio è stata utilizzata la linea MBL2 incubata a differenti dosi con il peptide m-TERT₁₉₈₋₂₀₅ (MBL2-p198) o con il peptide β -gal₉₆₋₁₀₃ (MBL2-p β gal), come controllo negativo.

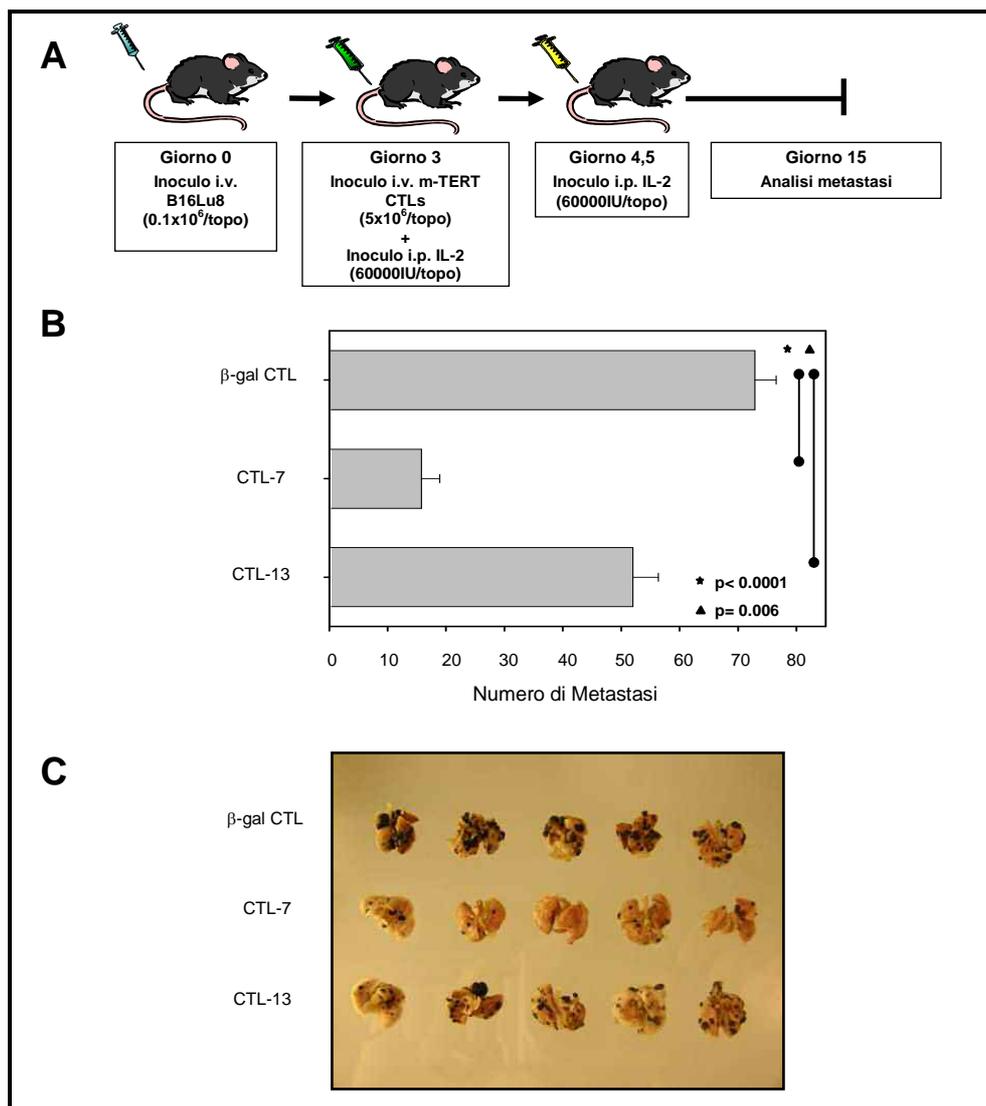


Figura 10: Effetto terapeutico del trasferimento adottivo di cloni CTL con diversa affinità per l'epitopo m-TERT₁₉₈₋₂₀₅.

A) Lo schema dell'impianto sperimentale prevede l'inoculo endovenoso di 0.1x10⁶ cellule della linea B16Lu8, linea di melanoma murino metastatizzante a livello polmonare, in topi C57BL/6J. Dopo 3 giorni dall'inoculo del tumore, gli animali vengono inoculati con 5x10⁶ di CTL. A un gruppo di animali (n=8) vengono inoculati i cloni ad alta affinità per l'epitopo m-TERT₁₉₈₋₂₀₅ (CTL-7), a un gruppo di animali (n=8) vengono inoculati i cloni a bassa affinità per l'epitopo m-TERT₁₉₈₋₂₀₅ (CTL-13) mentre al gruppo di controllo (n=8) vengono inoculati i cloni specifici per l'epitopo β-gal₉₆₋₁₀₃ (β-gal CTL). A entrambi i gruppi vengono somministrate 60000IU/topo/die di IL-2 ricombinante tramite inoculo i.p.. La somministrazione di IL-2 viene eseguita anche nei due successivi giorni dal trasferimento adottivo dei CTL. Gli animali vengono quindi sacrificati dopo 15 giorni dall'inoculo del tumore e i loro polmoni prelevati e fissati per la successiva conta delle metastasi.

B) Il numero di metastasi polmonari presenti negli animali trattati con il trasferimento adottivo di CTL del clone 7 (CTL-7) o del clone 13 (CTL-13) specifici per l'epitopo m-TERT₁₉₈₋₂₀₅ o dell'epitopo β-gal₉₆₋₁₀₃ (β-gal CTL) è rappresentato come media ± SE.

C) Immagine rappresentativa dei polmoni prelevati e fissati dopo 15 giorni dall'inoculo del tumore.

Valutazione dell'efficacia terapeutica delle due strategie vaccinali a DNA verso l'antigene TERT in un modello murino di carcinogenesi prostatica spontanea.

La nostra ricerca si è anche proposta di valutare l'efficacia terapeutica dei due protocolli di vaccinazione, descritti precedentemente, in un modello di carcinogenesi prostatica spontanea.

Abbiamo utilizzato come modello di studio il ceppo murino TRAMP (*Transgenic adenocarcinoma mouse prostate*, (Greenberg, DeMayo et al. 1995). Il ceppo di topi TRAMP è derivato dai topi C57BL/6J ed è caratterizzato dallo sviluppo, tra le 8-12 settimane di vita, di una neoplasia intraepiteliale prostatica che progredisce in adenocarcinoma invasivo nel 100% dei soggetti di 24-30 settimane. Il transgene responsabile dell'insorgenza del tumore (Tag di SV40) è sotto il controllo del promotore della probasina (PB) per cui, nonostante sia presente in tutte le cellule dell'animale, viene espresso nelle sole cellule epiteliali prostatiche a seguito dell'esposizione alla probasina, enzima prodotto durante l'età puberale del topo, che innesca la tumorigenesi. L'istologia e la storia naturale del tumore murino sono molto simili al tumore umano (Kaplan-Lefko, Chen et al. 2003). Tutti gli animali sono stati selezionati per la presenza del trasgene PB-Tag mediante analisi in PCR da DNA estratto da leucociti del sangue periferico. Solo gli animali risultati positivi allo screening sono stati adoperati per gli incroci. Dopo 23 generazioni, siamo riusciti ad ottenere una linea di topi in cui il transgene è presente in doppia copia (omozigoti). Questi topi sono stati quindi incrociati con animali C57BL/6J inbred per ottenere gli animali eterozigoti che sono stati utilizzati nei protocolli sperimentali che saranno descritti. L'analisi anatomo-patologica condotta nei nostri animali eterozigoti ha confermato l'istogenesi prostatica del tumore TRAMP, così come riportato in letteratura (Figura 11A).

Prima di intraprendere il percorso vaccinale, abbiamo affrontato due aspetti di primaria importanza, ovvero la valutazione del sistema immunitario dei topi TRAMP in fasi diverse della progressione tumorale e la verifica della presenza dell'antigene telomerasi a livello del sito tumorale.

Al fine di valutare lo stato immunologico degli animali portatori di tumore di diverso stadio, sono stati sacrificati gruppi (n=3) di topi TRAMP diversi per età (8, 24, 36 e 48 settimane di vita) ed estensione di malattia, e gli splenociti ottenuti

dagli animali sono stati analizzati per la risposta alla stimolazione *in vitro* con alloantigeni, mediante allestimento di colture leucocitarie miste (MLC). Dopo 5 giorni, le colture sono state saggiate contro bersagli allogenici e di controllo. I risultati hanno dimostrato che la capacità delle colture di produrre IFN- γ in risposta allo stimolo allogenico è conservata durante la progressione della neoplasia. Si è poi proceduto a valutare la risposta spontanea verso l'antigene m-TERT. Con gli stessi splenociti sono state allestite MLPC utilizzando come stimolo il peptide m-TERT₁₉₈₋₂₀₅. Le colture cellulari sono state successivamente ristimate con 10^5 cellule singeniche pulsate con il peptide di interesse (m-TERT₁₉₈₋₂₀₅) o con il peptide scorrelato (β -gal₉₆₋₁₀₃). Dopo 24 ore di incubazione il surnatante della coltura è stato sottoposto a saggio E.L.I.S.A. per quantificare il rilascio di IFN- γ . Abbiamo osservato una risposta assente nel gruppo di animali TRAMP di 8, 24 e 36; solo animali TRAMP di 48 settimane presentavano una debole risposta per l'antigene (Figura 11B). Poiché questa reattività è assente nei topi TRAMP di 8 settimane di età, in cui il processo tumorale si è appena avviato, mentre è presente in topi TRAMP di 48 settimane di vita, in cui il tumore è avanzato, è possibile ipotizzare che il sistema immune sia esposto all'antigene TERT durante la progressione tumorale, ma che tuttavia non è in grado di contrastare la crescita neoplastica. L'indagine è proseguita per valutare lo stato immunologico degli animali portatori di tumore a seguito dell'intervento vaccinale. Conseguentemente, animali TRAMP diversi per età (8, 24, 36 e 48 settimane di vita) sono stati vaccinati con un vettore adenovirale ricombinante (5×10^8 PFU/topo) codificante la proteina telomerasi. Dopo 14 giorni dalla vaccinazione gli animali sono stati sacrificati e gli splenociti sono stati stimolati per 24 ore con 10 U/ml di IL-2 ricombinante, in presenza di $1 \mu\text{g/ml}$ del peptide m-TERT₁₉₈₋₂₀₅ (p-198) o del peptide β -gal₉₆₋₁₀₃ (p- β gal), in un saggio ELISPOT per rilascio di IFN- γ . Come si evince dalla figura 11C, solo gli animali di 8 e 24 settimane di età presentano un'espansione di linfociti T in grado di riconoscere significativamente l'epitopo m-TERT₁₉₈₋₂₀₅ rispetto all'epitopo scorrelato β -gal₉₆₋₁₀₃, mentre gli animali di 36 e 48 settimane di età non mostrano una risposta analoga. L'analisi è proseguita anche dopo stimolazione *in vitro*, utilizzando gli splenociti per allestire MLPC con il peptide m-TERT₁₉₈₋₂₀₅. Dopo 5 giorni di coltura, le MLPC sono state testate sia in un saggio di citotossicità per rilascio di ^{51}Cr che in un test E.L.I.S.A. per il rilascio di IFN- γ , utilizzando come bersagli

cellulari la linea MBL2 pulsata con il peptide m-TERT₁₉₈₋₂₀₅ e la medesima linea cellulare pulsata con il peptide scorrelato β -gal₉₆₋₁₀₃. Entrambi i test funzionali hanno evidenziato come solo le MLPC degli animali TRAMP di 8 e 24 settimane di età presentavano una significativa capacità di riconoscere l'epitopo m-TERT₁₉₈₋₂₀₅ mentre le MLPC degli animali TRAMP di 36 e 48 settimane non contengono linfociti reattivi verso questo epitopo (Figura 11C). Limitatamente alle condizioni utilizzate, possiamo concludere che la finestra temporale efficace per la vaccinazione è limitata alla 36 settimana di vita poichè, oltre questo limite temporale, i topi TRAMP non sono in grado di montare una risposta immune per l'antigene TERT. Al momento, possiamo solo ipotizzare i motivi di questa inefficienza quali, ad esempio, fenomeni di tolleranza/soppressione indotti dal tumore; risulta evidente, comunque, che esiste un ampio arco temporale in cui intervenire somministrando ripetutamente il vaccino, per mantenere una buona risposta prolungata nel tempo anche nelle fasi di malattia avanzata.

Per dimostrare la presenza dell'antigene TERT nella prostata, durante lo sviluppo della neoplasia, abbiamo sfruttato un anticorpo policlonale specifico per l'isoforma murina di telomerasi in un'analisi immunocitochimica condotta dalla Dr.ssa Manuela Iezzi dell'Università di Chieti. Abbiamo potuto dimostrare che, se pur il tessuto prostatico normale presenta un'espressione basale di telomerasi, la proteina risulta iperespressa nelle fasi di iperplasia e soprattutto di adenocarcinoma (Figura 12). Questo dato avvalorava il significato dell'antigene telomerasi come TAA, in quanto la sua espressione differenziale ci permette di distinguere tessuto normale da tessuto tumorale. Verificato la presenza dell'antigene a livello del tumore prostatico, abbiamo paragonato l'efficacia terapeutica di due protocolli di vaccinazione per l'antigene TERT in animali TRAMP: il primo basato sull'immunizzazione tramite inoculo di DNA plasmidico e l'altro basato su un regime "prime-boost". Gli animali TRAMP sono stati vaccinati a partire dalla 6^a settimana di vita tramite un doppio inoculo di plasmide intervallato di 15 giorni (protocollo#1) o tramite l'inoculo del plasmide seguito dalla somministrazione di un vettore adenovirale ricombinante (protocollo#2), e un doppio richiamo con DNA plasmidico dopo 10 settimane dall'ultima somministrazione del vaccino. Per verificare l'efficacia dei suddetti protocolli vaccinali abbiamo sacrificato gli animali alla 24^a settimana di vita. Agli animali è stata prelevata la prostata per un'indagine istologica volta a valutare lo stadio

della progressione tumorale. Tale indagine ha mostrato che la vaccinazione a DNA plasmidico ha un impatto terapeutico: l'istologia del tessuto prostatico degli animali vaccinati con il plasmide vuoto ha svelato, infatti, quadri diffusi di iperplasia prostatica definita da cellule iperproliferanti che hanno perso la loro polarizzazione, mentre il tessuto prostatico degli animali vaccinati con l'antigene TERT presentavano aree di iperplasia meno estese. Questo può essere schematizzato dalla distribuzione percentuale di aree neoplastiche: in particolare, la prostata degli animali vaccinati con TERT è costituita da un 35% di tessuto sano e da un 8.75% di adenocarcinoma mentre le prostate degli animali vaccinati con il plasmide vuoto presentano un 6.17% di tessuto sano e un 24.30% di adenocarcinoma ($p < 0.05$). Al contrario la vaccinazione a "prime-boost" non ha presentato alcun effetto terapeutico: la percentuale di adenocarcinoma presente a livello delle prostate degli animali vaccinati contro telomerasi è risultata del tutto simile a quella presente a livello delle prostate degli animali di controllo (Figura 13).

Dato che la vaccinazione a "prime-boost" è risultata inefficace dal punto di vista terapeutico, abbiamo deciso di approfondire unicamente la vaccinazione a DNA plasmidico. In primo luogo abbiamo svolto un'indagine immunohistochimica, volta a valutare il differente infiltrato leucocitario nella sede tumorale tra animali vaccinati con il plasmide vuoto e quelli vaccinati con il plasmide codificante TERT. Questa indagine immunohistochimica ha evidenziato che le prostate degli animali vaccinati con TERT presentavano un infiltrato leucocitario nel sito tumorale, costituito in prevalenza da cellule fagocitiche (macrofagi) a cui si accompagnavano elementi della risposta immune adattativa (linfociti T $CD4^+$ e $CD8^+$), maggiore rispetto alle prostate degli animali vaccinati con il plasmide vuoto. La presenza di un infiltrato di linfociti T indica che queste cellule sono in grado di arrivare nella sede tumorale dopo immunizzazione attiva.

Infine, abbiamo dimostrato come la vaccinazione contro TERT determina anche un effetto terapeutico in termini di aumento di sopravvivenza. Gli animali TRAMP sono stati vaccinati a partire dalla 6^a settimana di vita con un protocollo che prevedeva un doppio inoculo di DNA plasmidico intervallato di 15 giorni e successivi richiami ogni 10 settimane per l'intera vita dell'animale. Abbiamo accertato che la vaccinazione è in grado di determinare un incremento medio di circa 11 settimane di sopravvivenza rispetto agli animali vaccinati con il plasmide

di controllo. Tale incremento della sopravvivenza inoltre è risultato indipendente dal costrutto plasmidico utilizzato nella vaccinazione. Infatti, un gruppo di topi TRAMP è stato vaccinato con il costrutto plasmidico pVIJnsA vuoto (n=8) o codificante TERT (n=8) mentre un gruppo di topi TRAMP è stato vaccinato con il costrutto plasmidico VICAL vuoto (n=8) o codificante m-TERT (n=8). Possiamo, quindi, concludere che l'utilizzo della vaccinazione a DNA contro telomerasi risulta avere un effetto preventivo nella progressione del carcinoma prostatico e potrebbe rappresentare un buon candidato per futuri approcci immunoterapeutici applicati all'uomo (Figura 14).

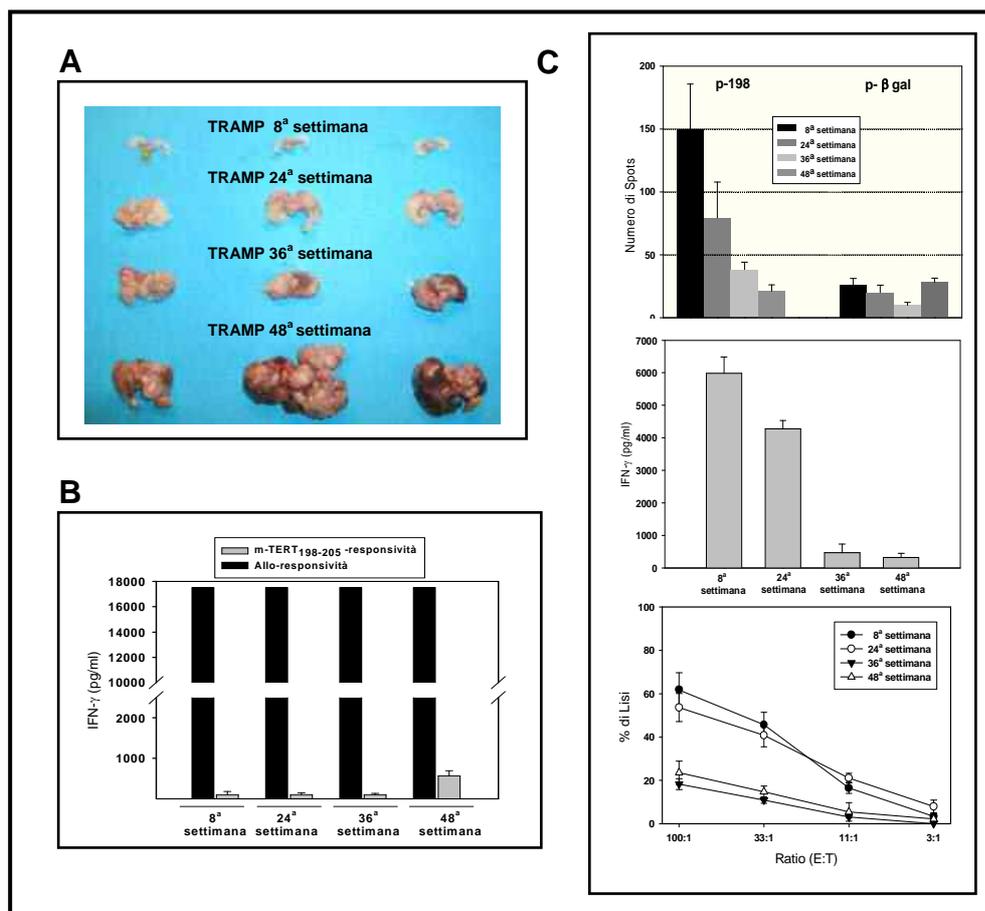


Figura 11: Analisi della capacità di topi TRAMP, in stadi diversi della progressione tumorale, di montare una risposta immunitaria nei confronti dell'epitopo m-TERT₁₉₈₋₂₀₅.

A) Immagine anatomo-patologica macroscopica rappresentativa di sezioni dell'apparato urogenitale di topi TRAMP di diverse età corrispondenti a fasi progressive della malattia.

B) Splenociti di topi TRAMP di diverse età sono stati messi in coltura per 5 giorni con 0.1μg/ml di peptide m-TERT₁₉₈₋₂₀₅ (MLPC) o con 3x10⁶ di splenociti allogeni irradiati (MLC). Per il test funzionale 0.1x10⁶ cellule di MLPC sono state cimentate per 24 ore, in rapporto 1:1, con la linea tumorale MBL2 pulsata o con il peptide β-gal₉₆₋₁₀₃ o con il peptide m-TERT₁₉₈₋₂₀₅, in 200 μl di volume finale, mentre 0.1x10⁶ cellule delle MLC sono state cimentate nelle medesime condizioni o con un bersaglio cellulare singenico (MBL2) o con un bersaglio cellulare allogenico (CT-26). In seguito, i surnatanti di coltura sono stati saggiati in un test E.L.I.S.A. per valutare il rilascio di IFN-γ. I valori sono espressi come differenza della concentrazione di IFN-γ rilasciato dalle MLPC /MLC incubate con il bersaglio specifico e quello rilasciato dopo incubazione con il bersaglio scorrelato.

C) Topi TRAMP di diverse età (n=3) sono stati vaccinati tramite inoculo di un adenovirus ricombinante codificante m-TERT. Dopo 14 giorni dalla vaccinazione gli animali sono stati sacrificati. 1x10⁶ splenociti di topi TRAMP, precedentemente vaccinati, sono stati stimolati per 24 ore con 10 U/ml di IL-2 ricombinante ed in presenza di 1μg/ml o del peptide m-TERT₁₉₈₋₂₀₅ (p-198) o del peptide β-gal₉₆₋₁₀₃ come controllo negativo, in un saggio ELISPOT per il rilascio di IFN-γ. I dati sono rappresentati come media ± SE di animali della stessa età. Successivamente gli splenociti di ciascun animale sono stati messi in coltura per 5 giorni con 0.1μg/ml di peptide m-TERT₁₉₈₋₂₀₅ (MLPC). Dopo 5 giorni le colture sono state saggiate sia in un test E.L.I.S.A. per il rilascio di IFN-γ sia in un test di rilascio di ⁵¹Cr utilizzando come bersaglio in entrambi i casi la linea cellulare MBL-2 pulsata con il peptide m-TERT₁₉₈₋₂₀₅ o con il peptide di controllo β-gal₉₆₋₁₀₃. I risultati in entrambi i test sono riportati come differenza o di rilascio di IFN-γ o di percentuale di lisi tra le MBL2 pulsate con il peptide m-TERT₁₉₈₋₂₀₅ e le MBL2 pulsate con il peptide β-gal₉₆₋₁₀₃. I dati sono rappresentati come media ± SE di animali della stessa età.

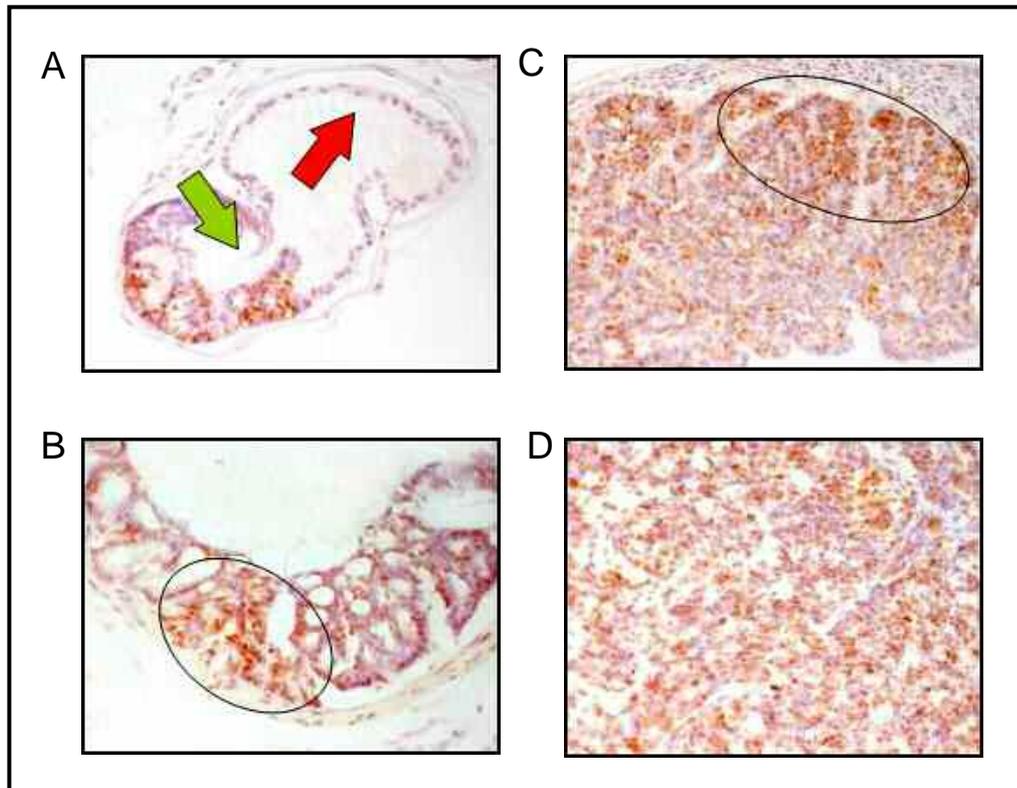


Figura 12: Valutazione dell'espressione di telomerasi a livello del tessuto prostatico tramite indagine immunohistochimica.

A) L'antigene telomerasi è scarsamente ed irregolarmente espresso nella parte normale dell'utricolo prostatico (freccia rossa) mentre diventa molto più evidente già dallo stadio di iniziale iperplasia (freccia verde).

B) Negli utricoli prostatici chiaramente iperplastici l'espressione dell'antigene rimane diffusa e risulta maggiormente presente nelle zone in cui c'è un maggior sovvertimento dell'architettura dell'organo, ovvero dove l'iperplasia diventa più aggressiva.

C) L'antigene telomerasi rimane iperespresso anche quando l'iperplasia si trasforma in adenocarcinoma. Anche in questo caso si nota una maggiore espressione sul fronte di invasione tumorale, dove in genere c'è anche più proliferazione.

D) Anche nel carcinoma indifferenziato la telomerasi risulta iperespressa, anche se in maniera variabile.

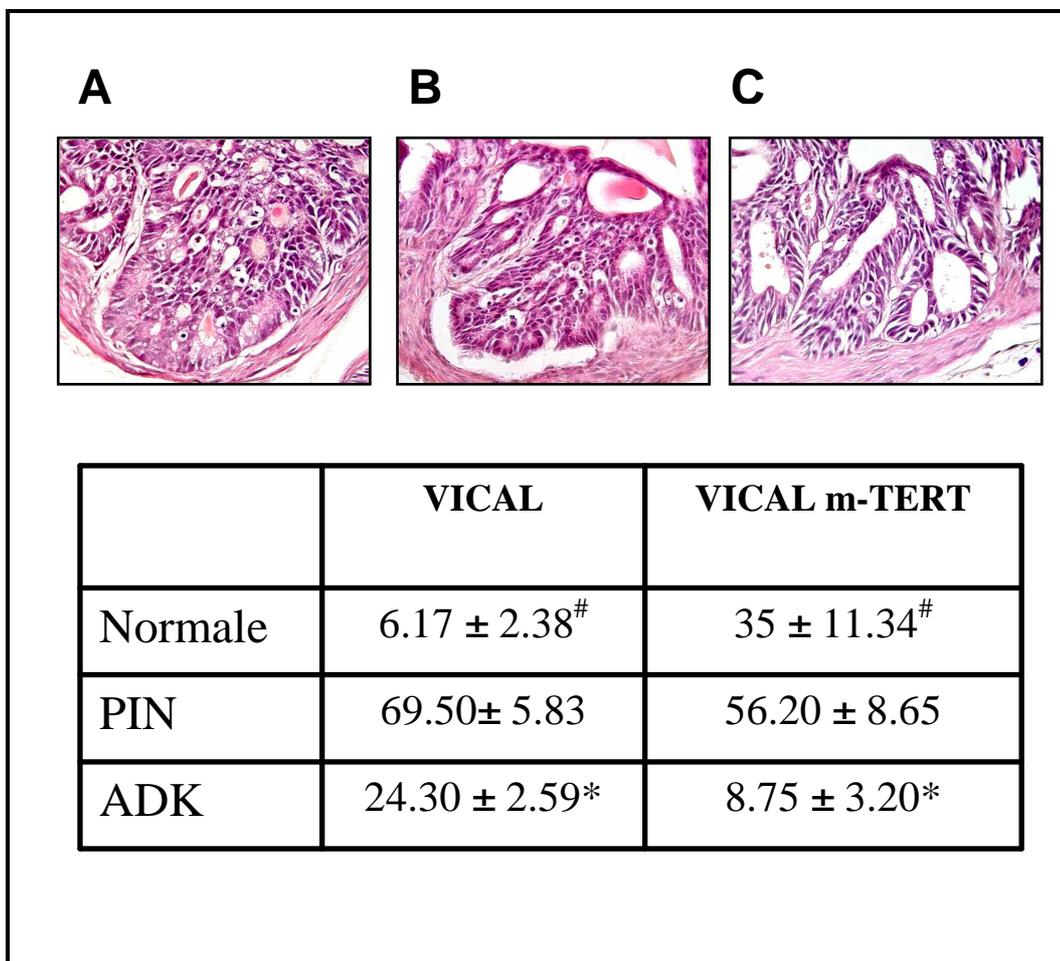


Figura 13: Analisi istologica del tessuto prostatico di animali TRAMP sottoposti a vaccinazione contro telomerasi.

Gli animali TRAMP sono stati vaccinati a partire dalla 6^a settimana di vita tramite un doppio inoculo di plasmide intervallato di 15 giorni, ed un doppio richiamo a DNA plasmidico dopo 10 settimane dall'ultima somministrazione del vaccino. Gli animali sono stati sacrificati alla 24^a settimana di vita.

L'istologia del tessuto prostatico degli animali vaccinati con il plasmide vuoto (B), similmente al tessuto prostatico di animali non trattati (A), presenta quadri diffusi di iperplasia prostatica definita da cellule iperproliferanti che hanno perso la loro polarizzazione, mentre il tessuto prostatico degli animali vaccinati con l'antigene TERT presenta aree di iperplasia meno estese (C).

Tabella riassuntiva dell'analisi istologica in cui i valori riportati rappresentano percentuali di area affetta ± SE. (* p< 0.05; [#]p<0.05)

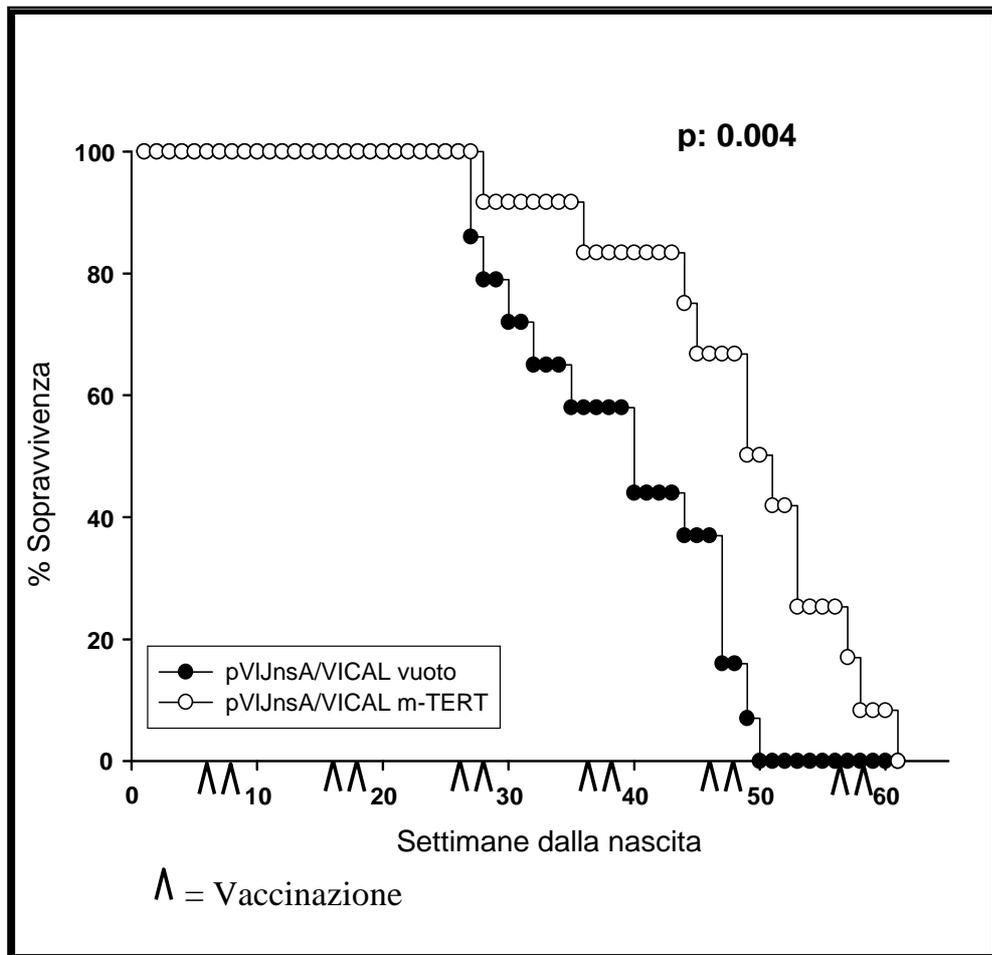


Figura. 15: Efficacia protettiva della vaccinazione con DNA codificante m-TERT.

Gruppi di 15 animali TRAMP sono stati inoculati i.m. con il plasmide codificante m-TERT (VICAL m-TERT/pVIJnsA m-TERT) o con il plasmide vuoto (VICAL/pVIJnsA). La scheda di vaccinazione prevede un doppio inoculo di plasmide intervallato di 15 giorni a partire dalla 6^a settimana di vita, e successivi richiami ogni 10 settimane per l'intera vita dell'animale.

DISCUSSIONE

Per esser considerato un candidato ideale per approcci di immunoterapia anti-tumorale, un TAA deve presentare delle caratteristiche fondamentali: *in primis*, in base alla sua espressione, deve esser in grado di discriminare il tessuto normale dal tessuto neoplastico; in secondo luogo, deve esser in grado di attivare effettori immunitari. L'enzima ribonucleoproteico telomerasi (TERT) responsabile dell'elongazione dei telomeri alle estremità dei cromosomi, riassume entrambe queste caratteristiche: infatti, come recentemente descritto in letteratura, h-TERT è sottoposta a processazione citosolica, similmente a quanto accade alle proteine endogene, ed i suoi peptidi presentati a livello della membrana plasmatica in associazione alle molecole MHC, sono riconosciuti da linfociti T (Vonderheide, Hahn et al. 1999). Inoltre, TERT è espressa in circa l'85% delle cellule tumorali, indipendentemente dalla loro origine e istologia, mentre è attiva solamente in alcune popolazioni cellulari endogene, quali cellule staminali, cellule germinative e linfociti attivati (Gross, Graff-Dubois et al. 2004). Tuttavia i livelli di espressione di TERT in queste popolazioni cellulari risultano inferiori di circa 100 volte se paragonate a quelli delle cellule tumorali. In questo lavoro di tesi abbiamo dimostrato che anche l'isoforma murina di TERT, similmente a quella umana, genera peptidi immunogenici a seguito della processazione endogena. In particolare, siamo riusciti ad identificare il peptide m-TERT₁₉₈₋₂₀₅ (VGRNFTNL) come epitopo immunodominante per aplotipo H-2^b (ristretto per l'allele K^b). Infatti, gli splenociti di animali con background C57BL/6J, vaccinati contro TERT, sono in grado di riconoscere unicamente questo peptide. Abbiamo dimostrato come, a livello della prostata dei topi TRAMP, l'espressione di TERT permetta di distinguere il tessuto prostatico normale dal tessuto tumorale. Infatti, TERT risulta espressa nella prostata normale ma a livelli decisamente inferiori rispetto agli stadi di neoplasia intraepiteliale (PIN) o di carcinoma.

L'utilizzo del modello murino TRAMP nei nostri studi trova il suo razionale nell'elevata omologia con la neoplasia umana, in termini di progressione di malattia e condivisione d'antigeni prostata-specifici. Questo agevola la traslazione dei risultati ottenuti dagli studi preclinici di immunoterapia, illustrati in questa tesi, all'ambito clinico. I nostri risultati dimostrano che i topi TRAMP sono immunocompetenti, indipendentemente dall'età e dall'estensione di malattia. Anzi, esiste una seppur debole reattività spontanea contro TERT che sembra

essere in relazione con l'avanzamento dello stato della patologia. Infatti, la reattività immunologica verso l'epitopo m-TERT₁₉₈₋₂₀₅ è assente nei topi di 8 settimane d'età (ancora privi di tumore infiltrante) ed appare in concomitanza con la progressione della malattia. E' importante notare che, nonostante la presenza di tale reattività, la crescita progressiva del tumore in tutti gli animali dimostra inequivocabilmente l'inefficacia della popolazione di linfociti m-TERT₁₉₈₋₂₀₅ - reattivi nel contrastare la progressione del tumore. Una spiegazione di questa mancata risposta è sicuramente da ricercare nei fenomeni di soppressione indotti dal microambiente tumorale. Da un recente studio pubblicato dal nostro laboratorio (Bronte, Kasic et al. 2005), risulta che i linfociti intratumorali dei topi TRAMP presentano un fenotipo di attivazione abortiva (CD44^{int}, CD62L⁻, CD25^{int}), paragonabile a quello descritto nei linfociti T umani melanoma specifici (Lee, Yee et al. 1999). Questo fenotipo è indotto dall'espressione di alti livelli degli enzimi ARG e NOS, presenti nell'epitelio prostatico neoplastico ma non in quello normale (Bronte, Kasic et al. 2005). A rafforzare il ruolo del microambiente tumorale nel condizionare l'attivazione degli effettori immunitari, è stata l'osservazione che solo animali privi di malattia o in presenza di una neoplasia ai primi stadi (animali di 24 settimane di età) sono responsivi alla vaccinazione, essendo capaci di montare una risposta immunitaria efficace e specifica per l'antigene somministrato, mentre animali portatori di tumori avanzati non sono in grado di innescare alcuna risposta immunitaria. La ricerca del miglior protocollo di vaccinazione ha evidenziato come il vaccino con solo DNA plasmidico, seguito dall'elettroporazione del sito di inoculo, sia più efficace (rispetto all'utilizzo di DNA plasmidico in combinazione con la somministrazione di vettori adenovirali ricombinanti) nel selezionare linfociti T CD8⁺ funzionali nel riconoscere il complesso MHC/m-TERT₁₉₈₋₂₀₅ presente a livello della membrana plasmatica delle cellule tumorali. Inoltre, la vaccinazione a solo DNA plasmidico risulta avere una capacità profilattica, inducendo un significativo rallentamento della progressione neoplastica nel modello TRAMP, dove al contrario il regime a "prime-boost" non ha dimostrato alcun effetto terapeutico. A sottolineare l'efficacia della vaccinazione a DNA è anche la capacità di richiamare, a livello del sito tumorale, un numero maggiore di effettori immunitari. A questo si aggiunga che i topi TRAMP vaccinati con due somministrazioni di plasmide codificante m-TERT, intervallati di quindici giorni l'una dall'altra, e successivi

richiami dopo 10 settimane, hanno dimostrato un significativo aumento in termini di sopravvivenza rispetto agli animali vaccinati con il plasmide vuoto. Questo effetto terapeutico è risultato indipendente dal costrutto plasmidico ma dipendente unicamente dalla sequenza antigenica. Sulla scorta dei dati ottenuti la strategia vaccinale futura prevederà di potenziare l'effetto terapeutico della vaccinazione associandola alla somministrazione di inibitori dell'attività di ARG e NOS che, come descritto in precedenza, sono responsabili del fenotipo abortivo dei TIL. Studi già pubblicati dal nostro gruppo, infatti, hanno dimostrato che l'impiego di inibitori dei due enzimi in combinazione consente un recupero funzionale di questi linfociti *in vitro* (Bronte, Kasic et al. 2005). La somministrazione di questi inibitori potrà avvenire in modo continuativo, o comunque per lunghi tempi, tramite l'utilizzo di una dieta medicata contenente i farmaci, in modo da non utilizzare metodiche invasive.

Gli studi *in vitro* ci hanno permesso di isolare dalle milze dei topi vaccinati con DNA plasmidico codificante TERT, popolazioni di CTL policlonali specifiche per l'epitopo m-TERT₁₉₈₋₂₀₅ capaci di riconoscere in modo efficace varie linee tumorali di diversa istologia ma con stesso aplotipo. Inoltre, siamo riusciti a caratterizzare per intero la sequenza della catena V α e V β del TCR di alcuni di questi linfociti. Questo ci consentirà di trasdurre linfociti T di topo con un recettore ad alta affinità per TERT e valutare l'impatto terapeutico in animali portatori di neoplasie TERT-positive.

Originale rispetto a quanto è riportato in letteratura è stato, infatti, lo studio eseguito sull'affinità dei CTL m-TERT specifici e soprattutto sul loro impiego in approcci di trasferimento cellulare adottivo in animali portatori di neoplasie di diversa istologia. Abbiamo, infatti, dimostrato che il trasferimento di CTL policlonali specifici per l'epitopo m-TERT₁₉₈₋₂₀₅, associato ad un regime di mielo-linfo-deplezione, è in grado di rallentare in modo significativo la crescita tumorale in due modelli di tumore trapiantabile (melanoma e carcinoma prostatico), quando paragonato all'inoculo di CTL specifici per un antigene irrilevante. Inoltre, usando un modello di metastatizzazione polmonare basato sull'inoculo di una linea cellulare di melanoma, abbiamo dimostrato che l'inoculo di CTL specifici per m-TERT₁₉₈₋₂₀₅ causa una significativa diminuzione del numero di metastasi rispetto ai controlli. L'effetto terapeutico risulta potenziato quando vengono inoculati CTL ad alta affinità per l'epitopo m-TERT₁₉₈₋₂₀₅. Per potenziare ulteriormente l'effetto

del trasferimento adottivo abbiamo di recente sfruttato l'utilizzo di aAPC sintetiche caricate con complessi MHC-peptide e molecole costimolatorie (CD80), dimostrando l'incremento dell'effetto terapeutico anche quando vengono inoculati linfociti T con TCR a bassa avidità (Zoso et al., 2008, inviato per la pubblicazione). Altra strategia che abbiamo percorso in questo ultimo periodo è la somministrazione ripetuta dei CTL. Abbiamo, infatti, utilizzato nel modello TRAMP un regime di trattamento che prevede tre somministrazioni di CTL a partire dalla 6^a settimana di vita, intervallate di 5 settimane l'una dall'altra. Interessante è poi la possibilità di applicare le metodiche descritte in questo lavoro nel modello murino trasgenico HLA-A*0201 (topi HHD), per isolare linfociti T con TCR specifico per il complesso umano costituito dalle molecole HLA-A2 e peptidi specifici per l'isoforma umana di TERT. Inoltre sarà possibile somministrare i CTL specifici per h-TERT in topi doppi knock-out per RAG-2 e per la catena γ comune al recettore di diverse citochine portatori di tumori umani. Questi topi sono deficitari per le popolazioni linfocitarie T, B cellule NK e NKT e consentono, conseguentemente, l'attecchimento di tumori umani, escludendo il rischio di rigetto dovuto al xenotrapianto o qualunque altro coinvolgimento del sistema immunitario dell'animale ospite nell'azione antitumorale. Questo modello rappresenta la piattaforma ideale per traslare gli studi dal campo sperimentale a quello clinico.

BIBLIOGRAFIA

- Acuto, O. and F. Michel (2003). "CD28-mediated co-stimulation: a quantitative support for TCR signalling." Nat Rev Immunol **3**(12): 939-51.
- Appay, V., P. R. Dunbar, et al. (2002). "Memory CD8+ T cells vary in differentiation phenotype in different persistent virus infections." Nat Med **8**(4): 379-85.
- Bach, E. A., M. Aguet, et al. (1997). "The IFN gamma receptor: a paradigm for cytokine receptor signaling." Annu Rev Immunol **15**: 563-91.
- Bacich, D. J., J. T. Pinto, et al. (2001). "Cloning, expression, genomic localization, and enzymatic activities of the mouse homolog of prostate-specific membrane antigen/NAALADase/folate hydrolase." Mamm Genome **12**(2): 117-23.
- Baniyash, M. (2004). "TCR zeta-chain downregulation: curtailing an excessive inflammatory immune response." Nat Rev Immunol **4**(9): 675-87.
- Bernhardt, S. L., M. K. Gjertsen, et al. (2006). "Telomerase peptide vaccination of patients with non-resectable pancreatic cancer: A dose escalating phase I/II study." Br J Cancer **95**(11): 1474-82.
- Bronte, V., E. Apolloni, et al. (2000). "Identification of a CD11b(+)/Gr-1(+)/CD31(+) myeloid progenitor capable of activating or suppressing CD8(+) T cells." Blood **96**(12): 3838-46.
- Bronte, V., S. Cingarlini, et al. (2003). "Effective genetic vaccination with a widely shared endogenous retroviral tumor antigen requires CD40 stimulation during tumor rejection phase." J Immunol **171**(12): 6396-405.
- Bronte, V., T. Kasic, et al. (2005). "Boosting antitumor responses of T lymphocytes infiltrating human prostate cancers." J Exp Med **201**(8): 1257-68.
- Bronte, V., P. Serafini, et al. (2003). "L-arginine metabolism in myeloid cells controls T-lymphocyte functions." Trends Immunol **24**(6): 302-6.
- Bronte, V. and P. Zanovello (2005). "Regulation of immune responses by L-arginine metabolism." Nat Rev Immunol **5**(8): 641-54.
- Bui, J. D. and R. D. Schreiber (2007). "Cancer immunosurveillance, immunoediting and inflammation: independent or interdependent processes?" Curr Opin Immunol **19**(2): 203-8.
- Burnet, F. M. (1970). "The concept of immunological surveillance." Prog Exp Tumor Res **13**: 1-27.
- Burnet, M. (1964). "Immunological Factors in the Process of Carcinogenesis." Br Med Bull **20**: 154-8.
- Burstein, N. A. and L. W. Law (1971). "Neonatal thymectomy and non-viral mammary tumours in mice." Nature **231**(5303): 450-2.
- Calarota, S. A. and D. B. Weiner (2004). "Enhancement of human immunodeficiency virus type 1-DNA vaccine potency through incorporation of T-helper 1 molecular adjuvants." Immunol Rev **199**: 84-99.
- Cheever, M. A., P. D. Greenberg, et al. (1980). "Specificity of adoptive chemoimmunotherapy of established syngeneic tumors." J Immunol **125**(2): 711-4.
- Choudhury, A., S. Mosolits, et al. (2006). "Clinical results of vaccine therapy for cancer: learning from history for improving the future." Adv Cancer Res **95**: 147-202.

- Cohen, C. J., Z. Zheng, et al. (2005). "Recognition of fresh human tumor by human peripheral blood lymphocytes transduced with a bicistronic retroviral vector encoding a murine anti-p53 TCR." *J Immunol* **175**(9): 5799-808.
- Cohen, E. P. (2001). "DNA-based vaccines for the treatment of cancer--an experimental model." *Trends Mol Med* **7**(4): 175-9.
- Colombo, M. P. and S. Piconese (2007). "Regulatory-T-cell inhibition versus depletion: the right choice in cancer immunotherapy." *Nat Rev Cancer* **7**(11): 880-7.
- Comoli, P., R. De Palma, et al. (2004). "Adoptive transfer of allogeneic Epstein-Barr virus (EBV)-specific cytotoxic T cells with in vitro antitumor activity boosts LMP2-specific immune response in a patient with EBV-related nasopharyngeal carcinoma." *Ann Oncol* **15**(1): 113-7.
- Cong, Y. S., W. E. Wright, et al. (2002). "Human telomerase and its regulation." *Microbiol Mol Biol Rev* **66**(3): 407-25, table of contents.
- Cortez-Gonzalez, X. and M. Zanetti (2007). "Telomerase immunity from bench to bedside: round one." *J Transl Med* **5**: 12.
- De, A. K., C. L. Miller-Graziano, et al. (2005). "Selective activation of peripheral blood T cell subsets by endotoxin infusion in healthy human subjects corresponds to differential chemokine activation." *J Immunol* **175**(9): 6155-62.
- De Palma, R., I. Marigo, et al. (2004). "Therapeutic effectiveness of recombinant cancer vaccines is associated with a prevalent T-cell receptor alpha usage by melanoma-specific CD8+ T lymphocytes." *Cancer Res* **64**(21): 8068-76.
- Dighe, A. S., E. Richards, et al. (1994). "Enhanced in vivo growth and resistance to rejection of tumor cells expressing dominant negative IFN gamma receptors." *Immunity* **1**(6): 447-56.
- Doe, B., M. Selby, et al. (1996). "Induction of cytotoxic T lymphocytes by intramuscular immunization with plasmid DNA is facilitated by bone marrow-derived cells." *Proc Natl Acad Sci U S A* **93**(16): 8578-83.
- Dudley, M. E., J. R. Wunderlich, et al. (2002). "Cancer regression and autoimmunity in patients after clonal repopulation with antitumor lymphocytes." *Science* **298**(5594): 850-4.
- Dudley, M. E., J. R. Wunderlich, et al. (2002). "A phase I study of nonmyeloablative chemotherapy and adoptive transfer of autologous tumor antigen-specific T lymphocytes in patients with metastatic melanoma." *J Immunother (1997)* **25**(3): 243-51.
- Dunn, G. P., A. T. Bruce, et al. (2002). "Cancer immunoediting: from immunosurveillance to tumor escape." *Nat Immunol* **3**(11): 991-8.
- Dunn, G. P., C. M. Koebel, et al. (2006). "Interferons, immunity and cancer immunoediting." *Nat Rev Immunol* **6**(11): 836-48.
- Dunn, G. P., L. J. Old, et al. (2004). "The immunobiology of cancer immunosurveillance and immunoediting." *Immunity* **21**(2): 137-48.
- Eng, M. H., L. G. Charles, et al. (1999). "Early castration reduces prostatic carcinogenesis in transgenic mice." *Urology* **54**(6): 1112-9.
- Engel, A. M., I. M. Svane, et al. (1997). "MCA sarcomas induced in scid mice are more immunogenic than MCA sarcomas induced in congenic, immunocompetent mice." *Scand J Immunol* **45**(5): 463-70.

- Fetsch, P. A., F. M. Marincola, et al. (1999). "The new melanoma markers: MART-1 and Melan-A (the NIH experience)." Am J Surg Pathol **23**(5): 607-10.
- Feunou, P., L. Poulin, et al. (2003). "CD4+CD25+ and CD4+CD25- T cells act respectively as inducer and effector T suppressor cells in superantigen-induced tolerance." J Immunol **171**(7): 3475-84.
- Filaci, G., M. Fravega, et al. (2006). "Frequency of telomerase-specific CD8+ T lymphocytes in patients with cancer." Blood **107**(4): 1505-12.
- Finn, O. J. (2003). "Cancer vaccines: between the idea and the reality." Nat Rev Immunol **3**(8): 630-41.
- Foster, B. A., J. R. Gingrich, et al. (1997). "Characterization of prostatic epithelial cell lines derived from transgenic adenocarcinoma of the mouse prostate (TRAMP) model." Cancer Res **57**(16): 3325-30.
- Gabrilovich, D. (2004). "Mechanisms and functional significance of tumour-induced dendritic-cell defects." Nat Rev Immunol **4**(12): 941-52.
- Gattinoni, L., C. A. Klebanoff, et al. (2005). "Acquisition of full effector function in vitro paradoxically impairs the in vivo antitumor efficacy of adoptively transferred CD8+ T cells." J Clin Invest **115**(6): 1616-26.
- Gattinoni, L., D. J. Powell, Jr., et al. (2006). "Adoptive immunotherapy for cancer: building on success." Nat Rev Immunol **6**(5): 383-93.
- Gelbard, A., C. T. Garnett, et al. (2006). "Combination chemotherapy and radiation of human squamous cell carcinoma of the head and neck augments CTL-mediated lysis." Clin Cancer Res **12**(6): 1897-905.
- Gingrich, J. R., R. J. Barrios, et al. (1996). "Metastatic prostate cancer in a transgenic mouse." Cancer Res **56**(18): 4096-102.
- Grabert, R. C., L. P. Cousens, et al. (2006). "Human T cells armed with Her2/neu bispecific antibodies divide, are cytotoxic, and secrete cytokines with repeated stimulation." Clin Cancer Res **12**(2): 569-76.
- Grant, G. A. and J. F. Miller (1965). "Effect of neonatal thymectomy on the induction of sarcomata in C57 BL mice." Nature **205**(976): 1124-5.
- Greenberg, N. M., F. DeMayo, et al. (1995). "Prostate cancer in a transgenic mouse." Proc Natl Acad Sci U S A **92**(8): 3439-43.
- Gross, D. A., S. Graff-Dubois, et al. (2004). "High vaccination efficiency of low-affinity epitopes in antitumor immunotherapy." J Clin Invest **113**(3): 425-33.
- Grover, A., G. J. Kim, et al. (2006). "Intralymphatic dendritic cell vaccination induces tumor antigen-specific, skin-homing T lymphocytes." Clin Cancer Res **12**(19): 5801-8.
- Hahn, W. C. and M. Meyerson (2001). "Telomerase activation, cellular immortalization and cancer." Ann Med **33**(2): 123-9.
- Harlin, H., T. V. Kuna, et al. (2006). "Tumor progression despite massive influx of activated CD8(+) T cells in a patient with malignant melanoma ascites." Cancer Immunol Immunother **55**(10): 1185-97.
- Hastie, N. D., M. Dempster, et al. (1990). "Telomere reduction in human colorectal carcinoma and with ageing." Nature **346**(6287): 866-8.
- Hendriks, J., L. A. Gravestein, et al. (2000). "CD27 is required for generation and long-term maintenance of T cell immunity." Nat Immunol **1**(5): 433-40.
- Hildeman, D. A., T. Mitchell, et al. (2003). "Control of Bcl-2 expression by reactive oxygen species." Proc Natl Acad Sci U S A **100**(25): 15035-40.

- Hsu, F. J., C. Benike, et al. (1996). "Vaccination of patients with B-cell lymphoma using autologous antigen-pulsed dendritic cells." Nat Med **2**(1): 52-8.
- Hu, H. M., H. Winter, et al. (2000). "Divergent roles for CD4+ T cells in the priming and effector/memory phases of adoptive immunotherapy." J Immunol **165**(8): 4246-53.
- Huang, X., M. Bennett, et al. (2004). "Anti-tumor effects and lack of side effects in mice of an immunotoxin directed against human and mouse prostate-specific membrane antigen." Prostate **61**(1): 1-11.
- Hubert, R. S., I. Vivanco, et al. (1999). "STEAP: a prostate-specific cell-surface antigen highly expressed in human prostate tumors." Proc Natl Acad Sci U S A **96**(25): 14523-8.
- Kaech, S. M., J. T. Tan, et al. (2003). "Selective expression of the interleukin 7 receptor identifies effector CD8 T cells that give rise to long-lived memory cells." Nat Immunol **4**(12): 1191-8.
- Kagamu, H., J. E. Touhalisky, et al. (1996). "Isolation based on L-selectin expression of immune effector T cells derived from tumor-draining lymph nodes." Cancer Res **56**(19): 4338-42.
- Kanegane, H., K. Nomura, et al. (2002). "Biological aspects of Epstein-Barr virus (EBV)-infected lymphocytes in chronic active EBV infection and associated malignancies." Crit Rev Oncol Hematol **44**(3): 239-49.
- Kaplan-Lefko, P. J., T. M. Chen, et al. (2003). "Pathobiology of autochthonous prostate cancer in a pre-clinical transgenic mouse model." Prostate **55**(3): 219-37.
- Kaplan, D. H., V. Shankaran, et al. (1998). "Demonstration of an interferon gamma-dependent tumor surveillance system in immunocompetent mice." Proc Natl Acad Sci U S A **95**(13): 7556-61.
- Kawakami, Y., M. I. Nishimura, et al. (1993). "T-cell recognition of human melanoma antigens." J Immunother Emphasis Tumor Immunol **14**(2): 88-93.
- Kershaw, M. H., M. W. Teng, et al. (2005). "Supernatural T cells: genetic modification of T cells for cancer therapy." Nat Rev Immunol **5**(12): 928-40.
- Khong, H. T. and N. P. Restifo (2002). "Natural selection of tumor variants in the generation of "tumor escape" phenotypes." Nat Immunol **3**(11): 999-1005.
- Kieper, W. C., A. Troy, et al. (2005). "Recent immune status determines the source of antigens that drive homeostatic T cell expansion." J Immunol **174**(6): 3158-63.
- Kim, N. W., M. A. Piatyszek, et al. (1994). "Specific association of human telomerase activity with immortal cells and cancer." Science **266**(5193): 2011-5.
- Klebanoff, C. A., H. T. Khong, et al. (2005). "Sinks, suppressors and antigen presenters: how lymphodepletion enhances T cell-mediated tumor immunotherapy." Trends Immunol **26**(2): 111-7.
- Klein, G. (1966). "Tumor antigens." Annu Rev Microbiol **20**: 223-52.
- Kobayashi, Y., T. Higashi, et al. (2000). "Expression of MAGE, GAGE and BAGE genes in human liver diseases: utility as molecular markers for hepatocellular carcinoma." J Hepatol **32**(4): 612-7.
- Koya, R. C., N. Kasahara, et al. (2003). "Potent maturation of monocyte-derived dendritic cells after CD40L lentiviral gene delivery." J Immunother (1997) **26**(5): 451-60.

- Krieg, A. M. (2002). "CpG motifs in bacterial DNA and their immune effects." Annu Rev Immunol **20**: 709-60.
- Kuball, J., F. W. Schmitz, et al. (2005). "Cooperation of human tumor-reactive CD4+ and CD8+ T cells after redirection of their specificity by a high-affinity p53A2.1-specific TCR." Immunity **22**(1): 117-29.
- Lanzavecchia, A. and F. Sallusto (2002). "Progressive differentiation and selection of the fittest in the immune response." Nat Rev Immunol **2**(12): 982-7.
- Larin, S. S., G. P. Georgiev, et al. (2004). "Gene transfer approaches in cancer immunotherapy." Gene Ther **11 Suppl 1**: S18-25.
- Lee, P. P., C. Yee, et al. (1999). "Characterization of circulating T cells specific for tumor-associated antigens in melanoma patients." Nat Med **5**(6): 677-85.
- Lipponen, P. K., M. J. Eskelinen, et al. (1992). "Tumour infiltrating lymphocytes as an independent prognostic factor in transitional cell bladder cancer." Eur J Cancer **29A**(1): 69-75.
- Lollini, P. L., F. Cavallo, et al. (2006). "Vaccines for tumour prevention." Nat Rev Cancer **6**(3): 204-16.
- Ludlow, J. W. (1993). "Interactions between SV40 large-tumor antigen and the growth suppressor proteins pRB and p53." Faseb J **7**(10): 866-71.
- Masutomi, K., S. Kaneko, et al. (2002). "Identification of serum anti-human telomerase reverse transcriptase (hTERT) auto-antibodies during progression to hepatocellular carcinoma." Oncogene **21**(38): 5946-50.
- Mavroudis, D., I. Bolonakis, et al. (2006). "A phase I study of the optimized cryptic peptide TERT(572y) in patients with advanced malignancies." Oncology **70**(4): 306-14.
- Mazzoni, A., V. Bronte, et al. (2002). "Myeloid suppressor lines inhibit T cell responses by an NO-dependent mechanism." J Immunol **168**(2): 689-95.
- Meyerson, M., C. M. Counter, et al. (1997). "hEST2, the putative human telomerase catalytic subunit gene, is up-regulated in tumor cells and during immortalization." Cell **90**(4): 785-95.
- Mihm, M. C., Jr., C. G. Clemente, et al. (1996). "Tumor infiltrating lymphocytes in lymph node melanoma metastases: a histopathologic prognostic indicator and an expression of local immune response." Lab Invest **74**(1): 43-7.
- Mocellin, S., S. Mandruzzato, et al. (2004). "Cancer vaccines: pessimism in check." Nat Med **10**(12): 1278-9; author reply 1279-80.
- Montgomery, D. L., J. W. Shiver, et al. (1993). "Heterologous and homologous protection against influenza A by DNA vaccination: optimization of DNA vectors." DNA Cell Biol **12**(9): 777-83.
- Moore, A. C. and A. V. Hill (2004). "Progress in DNA-based heterologous prime-boost immunization strategies for malaria." Immunol Rev **199**: 126-43.
- Morgan, R. A., M. E. Dudley, et al. (2006). "Cancer regression in patients after transfer of genetically engineered lymphocytes." Science **314**(5796): 126-9.
- Muranski, P., A. Boni, et al. (2006). "Increased intensity lymphodepletion and adoptive immunotherapy--how far can we go?" Nat Clin Pract Oncol **3**(12): 668-81.
- Nagorsen, D., M. Panelli, et al. (2003). "Biased epitope selection by recombinant vaccinia-virus (rVV)-infected mature or immature dendritic cells." Gene Ther **10**(20): 1754-65.

- Nair, S. K., A. Heiser, et al. (2000). "Induction of cytotoxic T cell responses and tumor immunity against unrelated tumors using telomerase reverse transcriptase RNA transfected dendritic cells." Nat Med **6**(9): 1011-7.
- Naito, Y., K. Saito, et al. (1998). "CD8+ T cells infiltrated within cancer cell nests as a prognostic factor in human colorectal cancer." Cancer Res **58**(16): 3491-4.
- Old, L. J. and E. A. Boyse (1964). "Immunology of Experimental Tumors." Annu Rev Med **15**: 167-86.
- Onizuka, S., I. Tawara, et al. (1999). "Tumor rejection by in vivo administration of anti-CD25 (interleukin-2 receptor alpha) monoclonal antibody." Cancer Res **59**(13): 3128-33.
- Parkhurst, M. R., J. P. Riley, et al. (2004). "Immunization of patients with the hTERT:540-548 peptide induces peptide-reactive T lymphocytes that do not recognize tumors endogenously expressing telomerase." Clin Cancer Res **10**(14): 4688-98.
- Pavlenko, M., A. K. Roos, et al. (2004). "A phase I trial of DNA vaccination with a plasmid expressing prostate-specific antigen in patients with hormone-refractory prostate cancer." Br J Cancer **91**(4): 688-94.
- Peng, Y., Y. Laouar, et al. (2004). "TGF-beta regulates in vivo expansion of Foxp3-expressing CD4+CD25+ regulatory T cells responsible for protection against diabetes." Proc Natl Acad Sci U S A **101**(13): 4572-7.
- Pertmer, T. M., M. D. Eisenbraun, et al. (1995). "Gene gun-based nucleic acid immunization: elicitation of humoral and cytotoxic T lymphocyte responses following epidermal delivery of nanogram quantities of DNA." Vaccine **13**(15): 1427-30.
- Powell, D. J., Jr., M. E. Dudley, et al. (2005). "Transition of late-stage effector T cells to CD27+ CD28+ tumor-reactive effector memory T cells in humans after adoptive cell transfer therapy." Blood **105**(1): 241-50.
- Quaglino, E., M. Iezzi, et al. (2004). "Electroporated DNA vaccine clears away multifocal mammary carcinomas in her-2/neu transgenic mice." Cancer Res **64**(8): 2858-64.
- Quaglino, E., S. Rolla, et al. (2004). "Concordant morphologic and gene expression data show that a vaccine halts HER-2/neu preneoplastic lesions." J Clin Invest **113**(5): 709-17.
- Radi, R. (2004). "Nitric oxide, oxidants, and protein tyrosine nitration." Proc Natl Acad Sci U S A **101**(12): 4003-8.
- Reiter, R. E., Z. Gu, et al. (1998). "Prostate stem cell antigen: a cell surface marker overexpressed in prostate cancer." Proc Natl Acad Sci U S A **95**(4): 1735-40.
- Reits, E. A., J. W. Hodge, et al. (2006). "Radiation modulates the peptide repertoire, enhances MHC class I expression, and induces successful antitumor immunotherapy." J Exp Med **203**(5): 1259-71.
- Romero, P., J. C. Cerottini, et al. (2004). "Monitoring tumor antigen specific T-cell responses in cancer patients and phase I clinical trials of peptide-based vaccination." Cancer Immunol Immunother **53**(3): 249-55.
- Rosenberg, S. A., J. J. Mule, et al. (1985). "Regression of established pulmonary metastases and subcutaneous tumor mediated by the systemic administration of high-dose recombinant interleukin 2." J Exp Med **161**(5): 1169-88.

- Rosenberg, S. A., J. R. Yannelli, et al. (1994). "Treatment of patients with metastatic melanoma with autologous tumor-infiltrating lymphocytes and interleukin 2." J Natl Cancer Inst **86**(15): 1159-66.
- Rubinstein, N., M. Alvarez, et al. (2004). "Targeted inhibition of galectin-1 gene expression in tumor cells results in heightened T cell-mediated rejection; A potential mechanism of tumor-immune privilege." Cancer Cell **5**(3): 241-51.
- Sasada, T., M. Kimura, et al. (2003). "CD4+CD25+ regulatory T cells in patients with gastrointestinal malignancies: possible involvement of regulatory T cells in disease progression." Cancer **98**(5): 1089-99.
- Schopfer, F. J., P. R. Baker, et al. (2003). "NO-dependent protein nitration: a cell signaling event or an oxidative inflammatory response?" Trends Biochem Sci **28**(12): 646-54.
- Schuler, W., I. J. Weiler, et al. (1986). "Rearrangement of antigen receptor genes is defective in mice with severe combined immune deficiency." Cell **46**(7): 963-72.
- Shankaran, V., H. Ikeda, et al. (2001). "IFN γ and lymphocytes prevent primary tumour development and shape tumour immunogenicity." Nature **410**(6832): 1107-11.
- Shay, J. W. and W. E. Wright (2002). "Telomerase: a target for cancer therapeutics." Cancer Cell **2**(4): 257-65.
- Sheil, A. G. (1986). "Cancer after transplantation." World J Surg **10**(3): 389-96.
- Speiser, D. E., R. Miranda, et al. (1997). "Self antigens expressed by solid tumors Do not efficiently stimulate naive or activated T cells: implications for immunotherapy." J Exp Med **186**(5): 645-53.
- Steinbrink, K., H. Jonuleit, et al. (1999). "Interleukin-10-treated human dendritic cells induce a melanoma-antigen-specific anergy in CD8(+) T cells resulting in a failure to lyse tumor cells." Blood **93**(5): 1634-42.
- Stennett, L. S., A. I. Riker, et al. (2004). "Expression of gp100 and CDK2 in melanoma cells is not co-regulated by a shared promoter region." Pigment Cell Res **17**(5): 525-32.
- Street, S. E., E. Cretney, et al. (2001). "Perforin and interferon-gamma activities independently control tumor initiation, growth, and metastasis." Blood **97**(1): 192-7.
- Stutman, O. (1974). "Tumor development after 3-methylcholanthrene in immunologically deficient athymic-nude mice." Science **183**(124): 534-6.
- Stutman, O. (1975). "Immunodepression and malignancy." Adv Cancer Res **22**: 261-422.
- Stutman, O. (1979). "Chemical carcinogenesis in nude mice: comparison between nude mice from homozygous matings and heterozygous matings and effect of age and carcinogen dose." J Natl Cancer Inst **62**(2): 353-8.
- Su, Z., J. Dannull, et al. (2005). "Telomerase mRNA-transfected dendritic cells stimulate antigen-specific CD8+ and CD4+ T cell responses in patients with metastatic prostate cancer." J Immunol **174**(6): 3798-807.
- Sussman, J. J., R. Parihar, et al. (2004). "Prolonged culture of vaccine-primed lymphocytes results in decreased antitumor killing and change in cytokine secretion." Cancer Res **64**(24): 9124-30.
- Sutmoller, R. P., L. M. van Duivenvoorde, et al. (2001). "Synergism of cytotoxic T lymphocyte-associated antigen 4 blockade and depletion of CD25(+) regulatory T cells in antitumor therapy reveals alternative pathways for

- suppression of autoreactive cytotoxic T lymphocyte responses." *J Exp Med* **194**(6): 823-32.
- Suzuki, E., V. Kapoor, et al. (2004). "Soluble type II transforming growth factor-beta receptor inhibits established murine malignant mesothelioma tumor growth by augmenting host antitumor immunity." *Clin Cancer Res* **10**(17): 5907-18.
- Takeda, K., M. J. Smyth, et al. (2002). "Critical role for tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand in immune surveillance against tumor development." *J Exp Med* **195**(2): 161-9.
- Terabe, M. and J. A. Berzofsky (2004). "Immunoregulatory T cells in tumor immunity." *Curr Opin Immunol* **16**(2): 157-62.
- Terabe, M., S. Matsui, et al. (2000). "NKT cell-mediated repression of tumor immunosurveillance by IL-13 and the IL-4R-STAT6 pathway." *Nat Immunol* **1**(6): 515-20.
- Thornburg, C., D. Boczkowski, et al. (2000). "Induction of cytotoxic T lymphocytes with dendritic cells transfected with human papillomavirus E6 and E7 RNA: implications for cervical cancer immunotherapy." *J Immunother (1997)* **23**(4): 412-8.
- Ulmer, J. B., J. J. Donnelly, et al. (1993). "Heterologous protection against influenza by injection of DNA encoding a viral protein." *Science* **259**(5102): 1745-9.
- Uyttenhove, C., L. Pilotte, et al. (2003). "Evidence for a tumoral immune resistance mechanism based on tryptophan degradation by indoleamine 2,3-dioxygenase." *Nat Med* **9**(10): 1269-74.
- Vandeputte, M. and P. De Somer (1965). "Influence of thymectomy on viral oncogenesis in rats." *Nature* **206**(983): 520-1.
- Vilella, R., D. Benitez, et al. (2003). "Treatment of patients with progressive unresectable metastatic melanoma with a heterologous polyvalent melanoma whole cell vaccine." *Int J Cancer* **106**(4): 626-31.
- Vonderheide, R. H., S. M. Domchek, et al. (2004). "Vaccination of cancer patients against telomerase induces functional antitumor CD8+ T lymphocytes." *Clin Cancer Res* **10**(3): 828-39.
- Vonderheide, R. H., W. C. Hahn, et al. (1999). "The telomerase catalytic subunit is a widely expressed tumor-associated antigen recognized by cytotoxic T lymphocytes." *Immunity* **10**(6): 673-9.
- Wang, L. X., W. X. Huang, et al. (2004). "Adoptive immunotherapy of cancer with polyclonal, 108-fold hyperexpanded, CD4+ and CD8+ T cells." *J Transl Med* **2**(1): 41.
- Widera, G., M. Austin, et al. (2000). "Increased DNA vaccine delivery and immunogenicity by electroporation in vivo." *J Immunol* **164**(9): 4635-40.
- Wittke, F., R. Hoffmann, et al. (1999). "Interleukin 10 (IL-10): an immunosuppressive factor and independent predictor in patients with metastatic renal cell carcinoma." *Br J Cancer* **79**(7-8): 1182-4.
- Wolf, A. M., D. Wolf, et al. (2003). "Increase of regulatory T cells in the peripheral blood of cancer patients." *Clin Cancer Res* **9**(2): 606-12.
- Wolff, J. A., R. W. Malone, et al. (1990). "Direct gene transfer into mouse muscle in vivo." *Science* **247**(4949 Pt 1): 1465-8.
- Workman, P., A. Balmain, et al. (1988). "UKCCCR guidelines for the welfare of animals in experimental neoplasia." *Lab Anim* **22**(3): 195-201.

- Wrzesinski, C., C. M. Paulos, et al. (2007). "Hematopoietic stem cells promote the expansion and function of adoptively transferred antitumor CD8 T cells." J Clin Invest **117**(2): 492-501.
- Xia, Y., L. J. Roman, et al. (1998). "Inducible nitric-oxide synthase generates superoxide from the reductase domain." J Biol Chem **273**(35): 22635-9.
- Xia, Y. and J. L. Zweier (1997). "Superoxide and peroxynitrite generation from inducible nitric oxide synthase in macrophages." Proc Natl Acad Sci U S A **94**(13): 6954-8.
- Yang, D., G. E. Holt, et al. (2001). "Murine six-transmembrane epithelial antigen of the prostate, prostate stem cell antigen, and prostate-specific membrane antigen: prostate-specific cell-surface antigens highly expressed in prostate cancer of transgenic adenocarcinoma mouse prostate mice." Cancer Res **61**(15): 5857-60.
- Zakian, V. A. (1997). "Life and cancer without telomerase." Cell **91**(1): 1-3.

ABBREVIAZIONI

2β-Me	2- β -Mercaptoetano
Ab	Anticorpo
ACT	Trasferimento adottivo cellulare
Ag	Antigene
APC	Cellula presentante l'antigene
ARG	Arginasi
β-gal	β -galattosidasi
CD	Cluster di differenziazione
CTL	Linfocita T citotossico
CpG	Dinucleotidi citosina-fosfato-guanina
DC	Cellula dendritica
DNA-PK	Protein chinasi DNA-dipendente
EDTA	Acido etilendiaminotetracetico
E.L.I.S.A.	Enzyme-linked Immunosorbent Assay
FACS	Fluorescence Activated Cell Sorting
FBS	Siero fetale bovino
FITC	Fluoresceina isotiocianato
G-CSF	Fattore stimolante la crescita di colonie di granulociti
GM-CSF	Fattore stimolante la crescita di colonie di granulociti e macrofagi
GvHD	Reazione di rigetto verso l'ospite
H₂O₂	Perossido di idrogeno
H&E	Ematossilina eosina
HEPES	Acido 4-(2-idrossietil)-piperazin-1-etansulfonico
IDO	Indolamina 2,3-diossigenasi
IFN	Interferone
IL	Interleuchina
i.p.	Intraperitoneale
K.O.	Knock out
LAK	Cellule Killer attivate da linfochine
L-Arg	L-Arginina
mAb	Anticorpo monoclonale
MCA	Metilcolantrene
MHC	Complesso maggiore di istocompatibilità

MLC	Coltura leucocitaria mista
MLPC	Coltura leucocitaria stimolata con il peptide
MDSC	Cellule mieloidi soppressorie
Nf-kB	Nuclear factor kB
NK	Cellule killer naturali
NKT	Cellule T natural killer
NO	Ossido nitrico
NOS	Sintetasi dell'ossido nitrico
O₂⁻	Anione superossido
ONOO⁻	Perossinitriti
PAA	Antigeni prostata associati
PBS	Phosphate buffer saline, soluzione salina fosfato
PCR	Reazione a catena della polimerasi
PE	Phycoerythrin, Ficoeritrina
PSCA	Prostate stem cell antigen
PSMA	Prostate specific membrane antigen
RAG2	Recombination activating gene 2
RNOS	Specie reattive dell'ossido nitrico
ROS	Specie reattive dell'ossigeno
s.c.	Sottocute
SCID	Severe-combined immunodeficiency
STEAP	Six transmembrane ephitelial antigen of prostate
T_{reg}	T regolatorie
TAA	Antigeni associati al tumore
TAP	Transporter associated with antigen
TCR	Recettore clonotipico dei linfociti T
TERT	Telomerasi
TGF-β	Fattore di crescita trasformante β
TIL	Linfociti infiltranti il tumore
Th	Linfociti T helper
TRAMP	Modello transgenico murino del carcinoma della prostata
w.t.	Wild type, tipo parentale

PUBBLICAZIONI

- Bronte V., Cingarlini S., Marigo I., De Santo C., Gallina G., Dolcetti L., **Ugel S.**, Peranzoni E., Mandruzzato S., Zanovello P. *Leukocyte infiltration in cancer creates an unfavorable environment for antitumor immune responses: a novel target for therapeutic intervention.* Immunol Invest. 2006; 35(3-4): 327-57.
- Peranzoni E., Marigo I., Dolcetti L., **Ugel S.**, Sonda N., Taschin E., Mantelli B., Bronte V. and Zanovello P. *Role of arginine metabolism in immunity and immunopathology.* Immunobiology 2008; 212(9-10): 795-812.

*R*ingraziamenti

Un grazie a Enzo per avermi permesso di vivere quest'entusiasmante avventura e per avermi retto per tre anni, un grazie altresì sentito alla Prof.ssa Zanovello per esser stata sempre disponibile e presente.

Un grazie a tutti coloro che hanno collaborato per la realizzazione di questo lavoro: il gruppo IRBM (Elisa, Carmela, Francesco, Barbara) il gruppo di Chieti (Manu, Marianna) e il Dr. De Palma.

Un grazie a quelle canaglie del laboratorio che ormai son diventate una seconda famiglia: grazie ILA per aver badato a me meglio di una mamma (ed è ora che lo diventi!), grazie Gigi per non avermi mai picchiato, grazie Sonda per la compagnia nelle serate alcoliche, grazie Zilio per le PCR, grazie Mantelli per non avermi mai urtato in pieno, grazie Circe per esser riuscita a legger quei tetrameri, grazie Audry per il corso di inglese...ah quasi dimenticavo...grazie (ed è un grazie speciale) Peranzoni per non esser mai d'accordo con me ma soprattutto per la tua infinita pazienza nel sopportarmi...e si che non peso tanto!

Un grazie particolare a Sara amica sincera e leale (hai visto il tuo virgulto come è stato bravo!) sempre presente se pur distante ma come dice De Gregori due buoni compagni di viaggio, anche se scelgono imbarchi diversi, saranno sempre due marinai!

Un grazie alla colonia TRAMP per aver sfornato in maniera continuativa le bestiole su cui mi son sbizzarito.

Un grazie ai due fratelli Paolo ed Elisabetta presenze insostituibili nella mia vita, un grazie alla due nonne sempre affettuose, un grazie agli zii e ai cugini sempre presenti, un grazie anche ai due cagnetti Birbo e Perla.

Un grazie speciale a mia mamma per avermi fatto testardo, un grazie speciale al mio papà per avermi fatto idealista e sognatore (e soprattutto interista). Vi voglio un gran bene e non posso far altro che dedicarvi questo lavoro che rappresenta la realizzazione di un traguardo in cui ho messo in gioco tutto me stesso tra sacrifici e fatiche ma sempre con tanta abnegazione e volontà e sempre con il sorriso....ce l'ho fatta!

